



UNIVERSIDAD PUBLICA DE NAVARRA

ESCUELA TECNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRONOMOS

TESIS DOCTORAL

***CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA DE LOS QUESOS CON
DENOMINACION DE ORIGEN RONCAL E IDIAZABAL
ELABORADOS EN NAVARRA***

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor en
Ciencias Biológicas por la Licenciada:

**CRISTINA ARIZCUN BIURRUN
PAMPLONA 1995**

LAS DRAS. PALOMA TORRE HERNANDEZ Y YOLANDA BARCINA ANGULO,
PROFESORAS DE LA UNIVERSIDAD PUBLICA DE NAVARRA

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado "CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA DE LOS QUESOS
CON DENOMINACION DE ORIGEN RONCAL E IDIAZABAL ELABORADOS EN NAVARRA",
del que es autora la Licenciada Dña. Cristina Arizcun Biurrun, ha sido realizado bajo nuestra
dirección y que cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente informe, en Pamplona
a tres de noviembre de mil novecientos noventa y cinco.

Fdo.: Paloma Torre Hernández
Profesora Titular del Area de Tecnología de Alimentos

Fdo.: Yolanda Barcina Angulo
Catedrática del Area de Nutrición y Bromatología

Desde estas líneas quiero expresar mi gratitud a todas las personas que de una u otra manera han contribuido a la realización de este trabajo:

A la Dra. Paloma Torre, por haberme iniciado en el camino de la investigación, depositando su confianza en mí y ayudándome a superar las dificultades que todo trabajo conlleva.

A la Dra. Yolanda Barcina, por su continua dedicación y apoyo a lo largo de todo este tiempo.

Al Dr. Javier Mendizábal, por su total disposición y ayuda cuando más lo necesitaba.

Al Departamento de Educación y Cultura del Gobierno de Navarra, por haberme concedido una beca para llevar a cabo este proyecto.

A D. Augusto Echeverría y a Dña. Sagrario Pérez, por sus consejos y colaboración cuando comencé en el Laboratorio Agrario de Villava.

Al Dr. Fox, por las orientaciones que me transmitió durante mi estancia en su laboratorio.

A Montse, Beatriz, Alicia, Delia y Cruz con las que compartí muchas horas de trabajo y quienes contribuyeron a hacer muy grata mi estancia en Villava.

A Miguel Aznárez, Ricardo Laspidea, Pedro Hualde, Juan Quintela, Nicolás Camino, familia Olaskoaga y familia Lasarte, por haberme abierto las puertas de sus queserías facilitándome la recogida de muestras.

A mis compañeros de la Universidad Pública de Navarra: Inés Arana, María Carbonell, Jesús Izco, Patricia Larráyo, Iosu Lázcoz, Susana Loygorri, Carlos Mendía, Eva Ochoa y María Oneca por sus continuas muestras de ánimo y amistad, y muy especialmente a Aurora Irigoyen y Patxi Ibáñez por haber tenido siempre tiempo para “echarme una mano”.

A Anabel Romano, compañera de fatigas durante la realización de esta tesis.

A Anabel Ordóñez, con quien me une una especial amistad, por estar siempre disponible.

Al personal de la biblioteca y del servicio de informática, por hacerme más fácil el trabajo.

A mis amigos, por haberme comprendido en muchas ocasiones.

A mi familia, con quienes he compartido mis agobios y alegrías durante estos años, por su apoyo incondicional.

A Josean, por tantas cosas.

A mis padres

ABREVIATURAS

Arg- arginina
B.O.E.- Boletín Oficial del Estado
C- cuajada
°C-grado centígrado
CINa- cloruro sódico
Cm- centímetro
col.- colaboradores
Coli- coliformes
Cys- cisteína
D- Denominación
°D- grado Dórnica
D.O.- Denominación de Origen
Ec- Enterococos
E. coli- Escherichia coli
Entb- enterobacterias
Entc- enterococos
E.S.- extracto seco
g- gramo
Glu- glutámico
He- heterofermentativos
His- histidina
Ho- homofermentativos
H₂O₂- peróxido de hidrógeno
I.C.M.S.F.- Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos
Ile- isoleucina
KDa- kilodaltons
Kg- kilogramo
L- litro
LAB- bacterias lácticas
Lact- lactococos
Lactb- lactobacilos
Lb- lactobacilos
Lc- lactococos
Le- leuconostoc
Leu- leucina
Lg- logaritmo
Lys- lisina
μ- micras
M- molar
Mes- flora aerobia mesófila
Met- metionina
mg- miligramo
M. Grasa- materia grasa
mL- mililitro
mM- milimolar
n- número de cepas
N.D.- no detectado

nm- nanómetros
Nº- número
OPA- o-Phthaldialdehydo
%- porcentaje
p- probabilidad
PEP/PTS- fosfoenol piruvato fosfotransferasa
Phe- fenilalanina
p-Leu- leucina para nitroanilida
p-Lys- lisina para nitroanilida
Pro- prolina
Prt⁻- proteinasa negativa
p/v- peso/volumen
Q- quesería
R²- coeficiente de determinación
S- estreptococos
SDS- dodecil sulfato de sodio
subsp.- subespecie
T^a- Temperatura
TTC- cloruro trifeniltetrazolio
ufc- unidades formadoras de colonias
Val - valina

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
1.1.- Quesos de Navarra con Denominación de Origen	2
1.1.1.- Situación actual	2
1.1.2.- Proceso de elaboración	3
1.1.3.- Características de los quesos	4
1.2.- La leche de oveja.....	6
1.2.1.- Composición química.....	6
1.2.2.- Características fisicoquímicas.....	8
1.2.3.- Características microbiológicas.....	9
1.2.3.1.- Calidad microbiológica de la leche para quesería	11
1.3.- Microbiología del queso.....	13
1.4.- Bacterias lácticas.....	16
1.4.1.- Origen.....	16
1.4.2.- Definición.....	16
1.4.3.- Clasificación.....	17
1.4.4.- Nivel.....	19
1.4.5.- Funciones.....	22
1.4.5.1.- Producción de ácido láctico y disminución del pH	22
1.4.5.2.- Producción de sustancias sápidas y aromáticas	25
1.4.5.3.- Proteolisis.....	27
1.4.6.- Metabolismo.....	28
1.4.6.1.- Metabolismo de la lactosa.....	28
1.4.6.2.- Metabolismo del citrato.....	31
1.4.7.- Utilización de las bacterias lácticas como cultivos iniciadores	32
1.4.8.- Sistema proteolítico.....	36
1.4.8.1.- Proteinasas.....	38
1.4.8.2.- Peptidasas.....	40
1.5.- Enterococos.....	42
1.5.1.- Origen.....	42
1.5.2.- Definición.....	43
1.5.3.- Taxonomía.....	44
1.5.4.- Nivel.....	45

1.5.5.- Funciones.....	47
1.5.5.1.- Indicadores de calidad higiénica.....	48
1.5.5.2.- Actividad proteolítica y producción de aromas	49
1.5.5.3.- Agente probiótico.....	51
1.5.6.- Sistema proteolítico.....	51
1.6.- Identificación de bacterias.....	52
1.6.1.- Interés.....	52
1.6.2.- Métodos de identificación.....	54
1.6.2.1.- Caracteres morfológicos.....	55
1.6.2.2.- Características fenotípicas y bioquímicas	55
1.6.2.3.- Técnicas quimiotaxonómicas	56
1.6.2.4.- Técnicas genotípicas.....	56
1.6.2.5.- Técnicas finger-Print.....	58
1.6.3.- Identificación de la flora láctica en quesos elaborados con leche cruda de oveja.....	60
1.7.- Objetivo e interés del presente trabajo	62
 2.- MATERIAL Y METODOS	63
2.1.- Toma de muestras.....	64
2.2.- Análisis microbiológicos.....	68
2.2.1.- Procesamiento de muestras.....	68
2.2.2.- Siembra de muestras.....	69
2.2.2.1.- Enterobacterias.....	69
2.2.2.2.- Coliformes.....	69
2.2.2.3.- Flora aerobia mesófila.....	70
2.2.2.4.- Lactococos.....	70
2.2.2.5.- Lactobacilos.....	70
2.2.2.6.- Leuconostoc.....	70
2.2.2.7.- Enterococos.....	70
2.2.3.- Recuento de microorganismos.....	71
2.3.- Análisis fisicoquímicos.....	71
2.3.1.- pH.....	71
2.3.2.- Materia grasa.....	72
2.3.3.- Acidez de la leche.....	72

2.3.4.- Densidad de la leche.....	73
2.3.5.- Extracto seco.....	73
2.4.- Identificación de bacterias lácticas y enterococos	73
2.4.1.- Identificación de lactococos.....	74
2.4.2.- Identificación de lactobacilos.....	77
2.4.3.- Identificación de leuconostoc.....	79
2.4.4.- Identificación de enterococos	80
2.5.-Actividades enzimáticas de los enterococos.....	83
2.5.1.- Medida de la actividad acidificante en leche descremada	84
2.5.2.- Obtención de células intactas	84
2.5.3.- Obtención de extractos libres de células.....	85
2.5.4.- Determinación de la concentración de proteínas en las células intactas y en los extractos libres de células.....	86
2.5.5.- Medida de la actividad aminopeptidásica	87
2.5.6.- Medida de la actividad proteásica.....	88
2.6.- Metodología estadística.....	90
 3.- RESULTADOS Y DISCUSION	 95
3.1.- Análisis fisicoquímico y microbiológico de la leche.....	96
3.1.1.- Comparación entre Denominaciones.....	96
3.1.2.- Comparación entre queserías.....	99
3.1.3.- Análisis de los componentes principales de la variación de los distintos parámetros estudiados en la leche	102
3.2.- Análisis fisicoquímicos y microbiológicos de los quesos de 120 días de maduración.....	105
3.2.1.- Comparación entre Denominaciones.....	105
3.2.2.- Comparación entre queserías.....	108
3.2.3.- Análisis de los componentes principales de la variación de los distintos parámetros estudiados en los quesos de 120 días de maduración.....	111
3.3.- Correlación entre los parámetros estudiados en la leche y en los quesos de 4 meses de maduración.....	114

3.4.- Caracterización de la evolución de los quesos a lo largo del periodo de maduración.....	116
3.4.1.- Estadística descriptiva.....	116
3.4.2.- Evolución de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de los quesos a lo largo de la maduración.....	118
3.4.2.1.- pH.....	119
3.4.2.2.- Extracto seco.....	121
3.4.2.3.- Materia grasa.....	124
3.4.2.4.- Flora aerobia mesófila.....	126
3.4.2.5.- Enterobacterias y Coliformes.....	128
3.4.2.6.- Lactococos y Lactobacilos.....	131
3.4.2.7.- Leuconostoc.....	134
3.4.2.8.- Enterococos.....	136
3.5.- Identificación de lactococos.....	138
3.5.1.- Comparación entre Denominaciones.....	140
3.5.2.- Comparación entre queserías.....	143
3.5.3.- Comparación entre estadios de maduración.....	145
3.6.- Identificación de lactobacilos.....	147
3.6.1.- Comparación entre Denominaciones.....	150
3.6.2.- Comparación entre queserías.....	153
3.6.3.- Comparación entre estadios de maduración.....	155
3.7.- Identificación de leuconostoc.....	157
3.7.1.- Comparación entre Denominaciones.....	160
3.7.2.- Comparación entre queserías.....	163
3.7.3.- Comparación entre estadios de maduración.....	165
3.7.4.- Comparación entre la leche y los quesos de 4 meses.....	167
3.8.- Identificación de enterococos.....	169
3.8.1.- Comparación entre Denominaciones.....	173
3.8.2.- Comparación entre queserías.....	175
3.8.3.- Comparación entre la leche y los quesos de 4 meses.....	176
3.9.- Actividades enzimáticas de los enterococos.....	178
3.9.1.- Test Api-Zym.....	178
3.9.2.- Actividad acidificante.....	180
3.9.3.- Concentración de proteína.....	181

3.9.4.- Actividad aminopeptidasa.....	182
3.9.4.1.- Comparación entre cepas.....	185
3.9.4.2.- Localización celular.....	186
3.9.4.3.- Influencia del pH.....	187
3.9.4.4.- Influencia del sustrato.....	188
3.9.5.- Actividad proteolítica.....	189
3.9.5.1.- Comparación entre cepas.....	189
3.9.5.2.- Localización celular.....	191
 4.- CONCLUSIONES	 193
 5.- RESUMEN	 197
 6.- BIBLIOGRAFIA.....	 202

1.- INTRODUCCION

1.1.- Quesos de Navarra con Denominación de Origen

1.1.1.- Situación actual

En la Comunidad Autónoma de Navarra se elaboran dos quesos con leche de oveja amparados con Denominación de Origen (D.O.):

- El queso Roncal. Se produce en los siete municipios que integran dicho valle: Uztarroz, Isaba, Urzainqui, Roncal, Garde, Vidángoz y Burgui.
- El queso Idiazábal. Tiene una fabricación semejante al elaborado en la Comunidad Autónoma Vasca, en el Noroeste de Navarra: Vertiente Atlántica, Valles del Noroeste, Sierras de Andía, Aralar y Urbasa y en la Zona Pirenaica, con excepción del Valle del Roncal.

El queso Roncal es el primer queso que obtuvo una Denominación de Origen en España. El Reglamento de la Denominación de Origen y su Consejo Regulador se aprobó por Orden Foral de 2 de marzo de 1981 del Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes del Gobierno de Navarra y se actualizó con fecha 11 de marzo de 1991 (B.O.E. 14-3-1991).

El primer Reglamento de la Denominación Origen Idiazábal se aprobó por Orden de 25 de noviembre de 1986 del Departamento de Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco y se ratificó con fecha del 1 de octubre de 1987 por parte del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Este Reglamento acogía únicamente a quesos elaborados en la Comunidad Autónoma Vasca.

Paralelamente, un decreto foral de fecha 29 de octubre de 1987 aprobó provisionalmente la Denominación de Origen Urbasa para el queso elaborado con leche de oveja, producido en Navarra, con exclusión del Valle del Roncal.

El 17 de marzo de 1989 los consejos reguladores de las Denominaciones de Origen Idiazábal y Urbasa acordaron la fusión de ambas en una "Denominación de Origen queso Idiazábal".

En su último Reglamento (Orden de 30 de noviembre de 1993 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) se amparan, por tanto, los quesos de oveja elaborados tanto en la Comunidad Autónoma Vasca como en Navarra con exclusión de las zonas acogidas a la Denominación Origen Roncal, mencionadas anteriormente (B.O.E. 3-12-1993).

La producción de queso en Navarra aumenta cada año. En 1993 se produjeron 398 toneladas de queso Roncal y 181 toneladas de queso Idiazábal, en 1994 esta cifra aumentó a 415 y 280 toneladas, respectivamente.

A pesar de este incremento la demanda actual de quesos es superior a la oferta. Sin embargo las posibilidades de una mayor producción se ven limitadas por la falta de leche de oveja disponible.

Navarra cuenta con un censo ovino de 600.000 ovejas, el 70% corresponde a ovino de carne (raza Rasa y sus cruces) y el 30% a oveja de raza Lacha (182.000). De éstas, únicamente 128.000 están sometidas a ordeño y producen algo más de 6 millones de litros de leche al año.

Hay que tener en cuenta que para elaborar un kilogramo de queso son precisos de 6 a 6,5 kg de leche de oveja Lacha o 5 kg de leche de oveja Rasa y que la producción media de leche por día de estas ovejas es solamente de 250 g (Hualde y col., 1989). Todos estos datos explican que el volumen de leche que se obtiene sea insuficiente para atender la demanda actual.

1.1.2.- Proceso de elaboración

El proceso de la elaboración y maduración del queso representa una serie de cambios consecutivos, que si están sincronizados y en equilibrio dan lugar a quesos con las características organolépticas deseables (Fox, 1993).

El proceso de elaboración de ambos tipos de quesos está recogido en las Reglamentaciones de las Denominaciones de Origen respectivas y por lo tanto, todos los productores se tienen que ajustar a ellas.

Existen algunos parámetros que permiten una cierta variabilidad lo que marca alguna de las diferencias que se observan entre los quesos elaborados por distintas queserías adscritas a una misma Denominación.

En ambas Denominaciones el proceso de elaboración sigue unas mismas etapas con algunas diferencias que se señalan en la tabla 1.

Tabla 1.- Diferencias y semejanzas del proceso de elaboración de los quesos acogidos a las Denominaciones de Origen Roncal e Idiazábal según sus respectivos Reglamentos.

	IDIAZABAL	RONCAL
Leche	cruda, de oveja Lacha o Carranzana	cruda, de oveja Lacha o Rasa
Cuajo	natural o artificial	natural o artificial

Fermentos	se pueden adicionar	se pueden adicionar
Tª cuajada	28 - 32 °C	32 - 37 °C
Tiempo coagulación	20 - 45 minutos	60 minutos
Corte de la cuajada	granos de 5 a 10 mm	-
Desuerado	recalentamiento hasta 38 °C	Tª constante todo el proceso
Prensado	en prensa	a mano o en prensa
Salado	inmersión en salmuera de 24 a 48 horas	en seco o en salmuera de 12 a 48 horas
Ahumado	optativo	no
Tiempo maduración	2 meses (mínimo)	4 meses (mínimo)

1.1.3.- Características de los quesos

Las Denominaciones de Origen exigen unas determinadas características externas de los quesos y unos mínimos en distintos parámetros fisicoquímicos con el fin de diferenciar y proteger a los quesos amparados por ellas. Estas características hacen referencia a la forma, altura, diámetro, peso, corteza, color de la pasta, número y distribución de los ojos, pH y porcentaje de grasa, extracto seco y proteína total.

Tabla 2.- Características finales de los quesos con D.O. Idiazábal y Roncal según sus respectivas Reglamentaciones.

Características	IDIAZABAL	RONCAL
Forma	cilíndrica, con caras sensiblemente planas	cilíndrica, con caras sensiblemente planas
Altura	8 - 12 cm	8 - 12 cm
Diámetro	10 - 30 cm	variable
Peso	1 - 3 kg	variable

Corteza	dura, de color amarillo pálido, si no es ahumado o pardo oscuro en caso de ser ahumado	dura, gruesa, áspera al tacto, grasa, mohosa o no, de color pardo o pajizo
Pasta	compacta, de color variable; desde el blanco al marfil amarillento	dura, color blanco amarillento al corte
Ojos	pocos y pequeños desigualmente repartidos	con poros pero sin ojos
Grasa	45% sobre extracto seco (mínimo)	50% sobre extracto seco (mínimo)
Extracto seco	55% (mínimo)	60% (mínimo)
pH	5,1 - 5,8	-
Proteína total	25% sobre extracto seco (mínimo)	-

1.2.- La leche de oveja

La leche es un líquido secretado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría.

La gran complejidad de la composición de la leche responde a la necesidad de servir de alimento exclusivo de los mamíferos en las primeras etapas del desarrollo.

1.2.1.- Composición química

Los componentes principales de la leche de oveja son: agua, lípidos, proteínas y glúcidos y en menor medida sales minerales, enzimas, urea y vitaminas.

Las caseínas constituyen el 82-83% de las proteínas totales, pudiendo este porcentaje cambiar algo según el momento de lactación (González de Llano y Ramos, 1989). Las caseínas se encuentran unidas a fosfato cálcico coloidal formando agregados denominados micelas (Varnam y Sutherland, 1994). Los estudios efectuados por métodos electroforéticos han puesto de manifiesto la existencia de 6 fracciones de caseína: α_s -caseína (α_{s1} , α_{s2} y α_{s3}), β -caseína (β_1 y β_2) y κ -caseína (Chianese y col., 1993).

El 17% restante de las proteínas de la leche está constituido por β -lactoglobulinas, α -lactoalbúminas, seroalbúminas, inmunoglobulinas y proteosomas-peptonas. El grupo de las albúminas (β -lactoglobulinas, α -lactoalbúminas y seroalbúminas) representa el 76,5% del contenido total de proteínas solubles.

La lactosa es el principal azúcar de la leche y representa del 22 al 27% del extracto seco total de la leche, su concentración varía entre un 4,5% y un 5%, decreciendo a lo largo del período de lactación. El contenido de lactosa es suficiente para asegurar la fermentación láctica. La influencia de este glúcido en el sabor y sobre las propiedades coligativas de la leche: presión osmótica, punto de ebullición y punto de congelación es importante (Varnam y Sutherland, 1994).

La materia grasa se presenta en forma de glóbulos grasos, envueltos en una membrana lipoproteica que estabiliza la emulsión y protege a los triglicéridos del ataque por enzimas lipolíticas (González de Llano y Ramos, 1989). Los triacilglicéridos suponen el 98% de la grasa total, también aparecen pequeñas cantidades de monoacilglicéridos y diacilglicéridos además de ácidos grasos libres (Assenat, 1991).

Tabla 3.- Composición media de la leche de oveja (Juárez y col., 1978 y 1984; Assenat, 1991; Goikoetxea, 1993).

Componentes	porcentaje (%)	Estado físico de los componentes
Agua	82,0	agua libre más agua ligada
Proteínas - caseínas (4,3%) - seroproteínas (1,05%)	5,4-6,0	suspensión micelar de fosfocaseinato cálcico solución coloidal
Glúcidos - lactosa	4,2-5,0	solución
Lípidos - glicéridos (98%) - fosfolípidos (0,8%) - insaponificable	6,6-7,5	emulsión de los glóbulos grasos
Nitrógeno no proteico	0,3	solución
Sales minerales	0,9	solución o estado coloidal
Vitaminas, enzimas	trazas	
Extracto seco	17,9-19,3	

El porcentaje de materia grasa es uno de los parámetros más variables de la leche de oveja ya que se ve influido por muchos factores: condiciones climáticas, alimentación, raza, condiciones de explotación del ordeño... Como muestra de la variabilidad de dicho porcentaje cabe indicar los resultados tan dispares que se obtuvieron en un estudio realizado en distintos países (Assenat, 1991): 6,04 en la U.R.S.S. (1969), 5,97 en Japón (1971), 7,43 en España (1972) y 8,70 en Yugoslavia (1976). En trabajos realizados con leche de oveja Lacha destinada a la producción de queso Idiazábal se obtuvieron porcentajes de grasa que fluctuaron entre 6,49 y 6,91 (Goikoetxea, 1993).

En general, los quesos de oveja tienen un gusto y aroma característico debido a la composición de los lípidos de la leche. Esta se caracteriza por su elevado contenido, en comparación con leches de otros animales, en ácidos grasos saturados de 6 a 12 átomos de carbono. Los ácidos cáprico y caprílico constituyen del 6 al 15% de los ácidos grasos totales.

La leche de oveja contiene distintas sales minerales, los compuestos mayoritariamente más importantes son el calcio (1,8-2,2 g/L), potasio (1,5-1,9 g/L), fósforo (1,2-1,6 g/L), sodio (0,4-0,6 g/L) y magnesio (0,1-0,2 g/L).

La presencia de calcio y fósforo es indispensable para la coagulación de la leche por adición de cuajo.

1.2.2.- Características fisicoquímicas

La leche de oveja tiene las características fisicoquímicas siguientes (Assenat, 1991):

El pH es del orden de 6,65, este valor fluctúa algo a lo largo del ciclo de lactación y se ve influido por la alimentación de las ovejas.

La acidez está comprendida entre 18 y 22 grados Dórnica.

La densidad media de la leche de oveja a 20 °C es de 1,036. Al comienzo del período de lactación es menos rica en grasa y la densidad es de 1,036, posteriormente la densidad aumenta a 1,037 y al final de la lactación, cuando tiene más grasa, disminuye a 1,035.

El índice de viscosidad de la leche de oveja es de 29,36 milipoises.

La tensión superficial es 49,9 dinas/cm.

El punto crioscópico se sitúa entre -0,570 y -0,575. Se observa una cierta evolución a lo largo del ciclo de lactación, siendo los valores ligeramente superiores en los meses de marzo, abril y mayo (Goikoetxea, 1993).

1.2.3.- Características microbiológicas

Aunque el ordeño de las ovejas se realice de una manera estéril, la leche siempre contiene microorganismos que en la mayoría de los casos, en animales sanos, son saprofíticos.

El nivel de microorganismos en el interior de la mama es del orden de 10^2 - 10^3 unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL), sin embargo los recuentos más bajos que se obtienen en leche fresca recién

ordeñada oscilan entre 10^3 y 10^4 ufc/mL (Hayes, 1992; Pérez-Elortondo, 1993a), e incluso se han detectado frecuentemente muestras de leche en granja que exceden de 10^6 ufc/mL (Núñez y col., 1984; Gaya y col., 1987; Fernández del Pozo y col., 1988a; Poulet y col., 1991). Este aumento se debe a que los microorganismos se multiplican rápidamente por ser la leche un medio muy rico en nutrientes.

Las fuentes de contaminación son varias (Cousins y Bramley, 1981):

- Interior de la mama: son gérmenes inocuos, si el animal está sano, que contaminan la leche en el momento de su obtención.
- Pezones y exterior de la ubre.
- Aire: el nivel de microorganismos en el aire no es muy importante comparado con el proveniente de las demás fuentes, sin embargo los géneros microbianos procedentes de éste (Clostridios, *Bacillus* y micrococos) son muy resistentes a condiciones adversas y pueden causar sabores y defectos en los productos elaborados con dicha leche (Olson y Mocquot, 1984).
- Utensilios empleados en el ordeño.
- Condiciones de almacenamiento: falta de refrigeración adecuada y/o tiempo prolongado.

Los géneros bacterianos que aparecen en un recuento de microorganismos en leche a su llegada a la quesería son muy diversos e incluyen especies de *Pseudomonas*, *Acromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, Coliformes y *Corynebacterium* (Cousins y Bramley, 1981). La contaminación fúngica es menos frecuente que la causada por las bacterias (Vadillo y col., 1987).

Tabla 4.- Nivel de microorganismos en muestras de leche cruda de oveja utilizadas en la elaboración de las distintas variedades de queso que se señalan.

Flora microbiana	LECHE DE OVEJA			
	Idiazábal (Pérez-Elortondo y col., 1993)	La Serena (Fernández del Pozo y col., 1988)	Casar de Cáceres (Poulet y col., 1991)	Manchego (Núñez y MartínezMoreno, 1976)
Mesófilos aerobios	4,70	7,08	5,91	4,68
Bacterias psicrofílas	4,69	-	-	-
<i>Lactococcus</i>	4,69	-	6,16	6,70
<i>Leuconostoc</i>	3,65	4,81	5,46	4.0

<i>Lactobacillus</i>	4,30	5,73	4,12	5,34
Enterobacterias	2,13	3,86	3,11	-
Coliformes	1,43	4,04	2,91	4,74
<i>Micrococcus</i>	2,30	-	3,60	4,60
<i>Enterococcus</i>	3,09	5,06	3,89	3,90
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	0,28	-	-	-
Mohos	2,13	1,12	3,14	-
Levaduras	2,13	3,83	3,51	-

Los datos se dan expresados en logaritmos de unidades formadoras de colonias por mililitro de leche (ufc/mL).

Cuando los animales sufren mastitis el contenido de bacterias es mayor (Cousins, 1978). La mastitis es una enfermedad de la ubre que en algunos casos produce cambios macroscópicos en la leche y en la ubre y otras veces sólo se puede diagnosticar por la detección de bacterias patógenas en un análisis de leche. Las infecciones son producidas principalmente por: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pasteurella haemolytica* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Clostridium perfringens* puede estar asociado con *Staphylococcus aureus* causando la mastitis gangrenosa (Núñez y col., 1989).

Además, el animal puede tener otras enfermedades y ser portador de varios microorganismos patógenos capaces de alcanzar la ubre por vía endógena. Los más comunes son: *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Coxiella burnetti* (Olson y Mocquot, 1984).

1.2.3.1.- Calidad microbiológica de la leche para quesería

La legislación actual, con respecto a la leche de oveja ha avanzado en los últimos años, aunque sigue siendo escasa comparada con la reglamentación existente para la de leche de vaca.

La última Directiva de la Comunidad Europea del 14 de septiembre de 1992 indica la norma que debe cumplir la leche cruda de oveja destinada a la elaboración de productos a base de leche cruda, cuyo proceso de fabricación no incluya ningún tratamiento térmico. Según dicha norma, el contenido de gérmenes a 30 °C debe ser inferior a 500.000 ufc/mL y el número de *Staphylococcus aureus* inferior a 500 ufc/mL, permitiéndose tolerancia para 2 muestras sobre 5 de 2.000 ufc/mL.

Por otra parte, en algunos países como Francia, se está instaurando el pago por calidad de la leche, lo que repercute en una mayor calidad de ésta.

El Boletín de la Asociación Interprofesional de la Leche de Oveja y Productos Lácteos derivados de ésta en la zona de los Pirineos Atlánticos establece unas puntuaciones de la leche en función de los niveles de gérmenes totales y coliformes (tabla 5). Las puntuaciones obtenidas cada mes dan lugar a la clasificación de la leche en A, B o C (tabla 6). Así mismo, el nivel de esporas butíricas por litro también permite catalogar la leche en uno de los mencionados grupos (tabla 7). Las leches consideradas como B o C reciben penalizaciones y su precio de venta es menor.

Tabla 5.- Puntuación para cada análisis de leche según el nivel de coliformes y gérmenes totales (Boletín de la Asociación Interprofesional de la Leche de Oveja y Productos Lácteos derivados de ésta en la zona de los Pirineos Atlánticos)

Coliformes por mL	Gérmenes totales por mL		
	menos de 100.000	100.000 - 250.000	más de 250.000
menos de 1.000	4	3	2
1.000 - 5.000	3	2	1
5.000 - 20.000	2	1	0
más de 20.000	1	0	0

Tabla 6.- Clasificación de la leche según la puntuación obtenida en el análisis de coliformes y gérmenes totales durante un mes.

Clasificación	Puntuaciones obtenidas		
	3 análisis	2 análisis	1 análisis
A	9 a 12 puntos	6 a 8 puntos	3 a 4 puntos
B	6 a 8 puntos	4 a 5 puntos	2 puntos
C	0 a 5 puntos	0 a 3 puntos	0 a 1 punto

Tabla 7.- Clasificación de la leche según el nivel de esporas butíricas obtenidas en un análisis por mes.

Clasificación	esporas por L
A	menos de 500
B	500 - 2.000
C	más de 2.000

En un trabajo llevado a cabo durante las campañas 91 y 92 con leche de oveja Lacha de Navarra y la Comunidad Autónoma Vasca (Goikoetxea, 1993), se establecieron las siguientes categorías según la calidad bacteriológica de la leche:

I.- < 300.000 ufc/mL

II.- 300.000 - 500.000 ufc/mL

III.- 500.000 - 1.000.000 ufc/mL

IV.- > 1.000.000 ufc/mL

Unicamente un 30% de los 5.884 controles de leche que se efectuaron obtuvieron la categoría I, mientras que un 37% de las leches se adscribieron a la categoría IV, lo que pone de manifiesto la necesidad de establecer medidas de control y mejora.

1.3.- Microbiología del queso

El proceso de maduración del queso se caracteriza por una serie de cambios físicos, químicos y microbiológicos complejos (Fernández-Salguero y col., 1989). En todos los sucesos que tienen lugar, los factores microbianos juegan un papel fundamental (Medina y col., 1989).

Una gran variedad de especies microbianas participan en el afinado de los quesos. La población supera generalmente 10^9 gérmenes por gramo. Este número no varía mucho a lo largo de la maduración, pero la proporción de las distintas especies está en continua evolución, y depende de las condiciones de crecimiento propias de cada grupo (Choisy y col., 1990). Por ello, tanto las características fisicoquímicas propias del medio (pH, actividad de agua, potencial redox, acidez) como las condiciones ambientales (temperatura, humedad), influyen notablemente en la flora microbiana capaz de desarrollarse (Trépanier y col., 1991).

Además es necesario tener en cuenta los fenómenos de competencia, sinergismo o antagonismo que aparecen entre los microorganismos (Stadhouders, 1975).

Debido al gran número y a la variabilidad de factores que afectan a la composición de la flora microbiana se puede decir que la maduración de los quesos es un proceso lento, no fácil de predecir (Fox, 1989). Por ello, es necesario realizar estudios microbiológicos con el fin de poder controlar, en la medida de lo posible, la fermentación de la leche y llegar a preparar un cultivo iniciador apropiado a cada tipo de queso (Ramos y col., 1982).

Son muchos los estudios que se han realizado sobre la microbiología de las distintas variedades de queso y es imposible mencionarlos todos, por ello aquí se van a señalar *grosso modo* las diferencias microbiológicas según su procedencia y el tratamiento térmico a que se somete a la leche de partida.

Los quesos pueden ser de vaca, oveja, cabra o bien mezcla de éstas. Las diferencias de la flora microbiana no son numericamente importantes, si bien la leche ovina puede tener mayor número de coliformes de origen fecal y micrococos ya que la contaminación en la recogida se ve incrementada por el gran número de ovejas que es necesario ordeñar para obtener una cantidad apreciable de leche (Assenat, 1991).

Al estudiar la flora de un queso de oveja es necesario diferenciar si la leche se pasteuriza o no ya que, numerosos investigadores (Scarpellino y Kosikowski, 1962; Gaya y Bautista, 1989; Lau y col., 1991) han encontrado diferencias entre quesos elaborados con una u otra leche. Una de las causas parece ser la desnaturalización de enzimas (Khalid y Marth, 1990a) y la destrucción de la flora termolábil, incluyendo bacterias lácticas y flora secundaria, al pasteurizar la leche (McSweeney y col., 1993).

En la tabla 8 se hace una revisión de los trabajos realizados sobre los quesos Roncal e Idiazábal que han servido de referencia para ahondar con más profundidad en la microbiología de estos quesos. Así mismo, se señalan algunos de los estudios más representativos de otras variedades de quesos similares elaborados con leche cruda de oveja. A lo largo del presente estudio se hará alusión a otros muchos.

Las bacterias lácticas son los principales organismos que intervienen en la transformación de la leche en queso y en la maduración de éste. Además existen otros muchos géneros bacterianos que tienen interés en la industria quesera: clostridios, enterococos, coliformes, enterobacterias, micrococos, bacterias propiónicas, bifidobacterias, *Achromobacter*, corinebacterias, flavobacterias, *Pseudomonas*, *Bacillus*, mohos y levaduras (Chapman y Sharpe, 1987; Botazzi, 1993)

Este trabajo se centrará fundamentalmente en las bacterias lácticas y en el género *Enterococcus*, por ser los que alcanzan un nivel más alto en número y llevan a cabo algunas de las funciones más importantes en la maduración del queso.

Tabla 8.- Estudios microbiológicos de los quesos más representativos elaborados únicamente con leche cruda de oveja.

QUESO	PROCEDENCIA	REFERENCIAS
Roncal	España	Ordóñez y col., 1980
Idiazábal	España	Barcina y col., 1988; Rodríguez y col., 1988; Pérez-Elortondo y col., 1993 a,b; Rúa y col., 1993.
Manchego	España	Martínez Moreno, 1976; Núñez y Martínez Moreno, 1976; Martínez Moreno y Núñez, 1976; Núñez, 1976 a,b,c; Ordóñez y col., 1978a.

La Serena	España	Martínez Manso y Fernández Salguero, 1978; Fernández del Pozo y col., 1988a; Fernández del Pozo y col., 1989.
Torta del Casar	España	Suárez y col., 1984a; Ruiz Iñiguez y col., 1984; Poullet y col., 1991; Poullet y col., 1993.
Roquefort	Francia	Devoyod y Muller, 1969.
Serra da Estrela	Portugal	Vieira de Sá y col., 1970; Macedo y col., 1993.
Pecorino Romano	Italia	Botazzi y Ledda, 1967; Deiana y col., 1984.
Feta	Grecia	Veinoglou y col., 1979; Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki, 1992; Litopoulou y col., 1993.

1.4.- Bacterias Lácticas

1.4.1.- Origen

La utilización de bacterias lácticas (LAB) para producir ácido durante la elaboración y maduración del queso, fue muy anterior al conocimiento de las bacterias que estaban implicadas en el proceso.

La leche se guardaba a temperatura ambiente varias horas. Durante este tiempo las bacterias lácticas se multiplicaban y producían ácido láctico. La leche se coagulaba y posteriormente se empleaba para inocular nueva leche con el fin de obtener queso.

Fue al final del siglo XIX cuando Storch en Dinamarca y Conn en Estados Unidos demostraron que a partir de cultivos puros de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se obtenía mantequilla con buenas cualidades organolépticas (Cogan y Hill, 1993). A partir de entonces se fueron ensayando distintas mezclas de LAB con el fin de obtener alimentos de las características deseadas (Gómez y Peláez, 1990).

1.4.2.- Definición

Según los criterios de Sharpe (1979) las bacterias lácticas son organismos Gram positivos. Morfológicamente son cocos no esporulados, cocobacilos o bacilos. Se dividen en un plano únicamente, con la excepción de los pediococos que lo hacen en dos. No poseen catalasa (aunque algunas cepas tienen una "pseudocatalasa", que se detecta cuando se cultivan en medios pobres en azúcares). Necesitan para crecer una fuente de carbono y fermentan la glucosa en unos casos a ácido láctico (homofermentativos) y en otros a ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético (heterofermentativos). Son anaerobios aerotolerantes, ya que aunque poseen un metabolismo exclusivamente fermentativo no son sensibles a la presencia de oxígeno (Stanier y col., 1991).

Botazzi (1993) completa con la siguiente descripción la definición de este grupo: microorganismos procariotas, heterotrofos y quimiorganotrofos, inmóviles, anaerobios facultativos que toleran pequeñas concentraciones de oxígeno, no poseen reductasa activa sobre el sustrato, ni citocromo oxidasa. Así mismo corrobora la tesis señalada, ya en 1919, por Orla Jensen que afirma que todos los géneros de bacterias lácticas poseen enzimas específicos del metabolismo energético comunes, lo que demuestra una estrecha relación filogenética.

Las bacterias lácticas son nutricionalmente fastidiosas y compiten, resultando favorecidas, con otros grupos de microorganismos en muchos alimentos. Esto es debido a que su metabolismo fermentativo crea un medio inhibitorio (bajo pH, bajo potencial redox, producción de ácidos orgánicos, agua oxigenada y antibióticos) y a su capacidad para utilizar un amplio rango de nutrientes en cada hábitat (Law y Kolstad, 1993).

1.4.3.- Clasificación

Orla Jensen (1919), fue el autor de la primera clasificación de las LAB que todavía, aunque en parte revisada, sigue siendo válida. Las características que estableció son en las que se basa la clasificación actual (tabla 9), aunque por ser un grupo tan amplio siempre ha habido algunas dificultades y controversias a la hora de clasificar los géneros (Hurst y Collins-Thompson, 1979).

En los últimos años, estudios de homología DNA-DNA (Johnson, 1984) han posibilitado la diferenciación de especies muy próximas. Lane y col. (1985) han estudiado las relaciones filogenéticas entre especies y géneros por medio del RNA ribosomal. Estas nuevas técnicas, además de profundizar en el conocimiento de las LAB, han permitido la descripción de nuevos géneros (Collins y col., 1990) y la escisión de otros anteriormente establecidos. Cabe señalar, a modo de ejemplo, cómo estudios de hibridación DNA-rRNA, han revelado que los estreptococos pueden ser divididos genéticamente en tres grupos (Schleifer, 1987): género *Streptococcus Sensu Stricto*, género *Enterococcus* y género *Lactococcus* (Schleifer y col., 1985).

Tabla 9.- Características diferenciales de los géneros de Bacterias Acido Lácticas (Sharpe, 1979; Hernández y Dubón, 1992a y Axelsson, 1993).

Características	BACTERIAS ACIDO LACTICAS				
	Lactobacilos	Leuconostoc	Estreptococos	Pediococos	Lactococos
Morfología	bacilos	cocos pares/cadena	cocos pares/cadena	cocos tétradas	cocos pares/cadena
Producción de CO₂ (b)	Ho, He	He	Ho	He	Ho

Crec.10 °C	±	+	-	±	+
Crec. 45 °C	±	-	±	±	-
Crec. 6,5% de ClNa	±	±	-	±	-
Crec. pH 9,6	-	-	-	-	-
Isómero del ácido láctico	D, L, DL ^e	D	L	L, DL ^e	L

+ positivo, - negativo y ± variable. Crec.=crecimiento.

(b) Producción de CO₂ a partir de la glucosa.

(Ho) Homofermentativos; (He) heterofermentativos.

(e) La producción de ácido láctico D-, L-, o DL-, varía entre especies.

En la actualidad, a pesar de todos los estudios que se han realizado, existen controversias sobre los géneros incluidos en el grupo de las bacterias lácticas. Botazzi (1993) considera que este grupo está constituido por los siguientes géneros:

- *Lactobacillus*.
- *Lactococcus*.
- *Streptococcus*.
- *Leuconostoc*.
- *Pediococcus*.

y así se va a considerar en este trabajo, teniendo siempre presente que en revisiones taxonómicas muy recientes se sugiere que las bacterias lácticas agrupan a 10 géneros distintos: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetra-genococcus* y *Vagococcus* (Axelsson, 1993), e incluso a 12 ya que, a los anteriormente mencionados se añaden los géneros *Atopobium* y *Bifidobacterium* (Dellaglio y col., 1994).

Es necesario señalar, por tanto, que aunque el género *Enterococcus* se va a tratar en diferente apartado, por seguir un orden y porque en la literatura se encuentra muchas veces separado de las generalidades del grupo de las bacterias lácticas, no se puede olvidar que posee muchas características morfológicas metabólicas y funcionales comunes a éstas.

1.4.4.- Nivel

Las bacterias lácticas constituyen la flora predominante del queso, tanto en los quesos elaborados con leche de oveja como en los procedentes de leche de vaca (Ramos y col., 1982; González de Llano y col., 1992) o en los fabricados con mezcla de leche de varias especies (Núñez, 1978).

Existen numerosos estudios sobre la evolución de los niveles de lactococos, lactobacilos y leuconostoc a lo largo de la maduración de los quesos. Ante la imposibilidad de abarcar todos ellos, este apartado se centrará exclusivamente en quesos elaborados con leche cruda de oveja (tabla 10).

En el queso Idiazábal, la flora láctica aumenta desde el comienzo de la elaboración hasta el prensado, donde alcanza un valor medio de $2,75 \cdot 10^8$ ufc/g de queso. El prensado parece ser el momento de la maduración más propicio para el crecimiento de las bacterias lácticas. Posteriormente el nivel se estabiliza y disminuye ligeramente al final de la maduración (Pérez-Elortondo y col., 1993 a y b).

En el queso Roncal también se ha constatado un aumento fuerte del número de bacterias lácticas durante los primeros días, obteniéndose recuentos de lactococos del orden de 10^9 ufc/g a los 30 días. A partir de dicho momento el nivel permanece más o menos constante (Ordóñez y col., 1980).

La evolución de la flora microbiana del queso Manchego muestra que las bacterias lácticas son siempre dominantes. Los lactococos aparecen como el grupo cuantitativamente más importante durante el primer mes de maduración con máximos del orden de 1 a $3 \cdot 10^9$ ufc/g a los 7-15 días.

En cambio los lactobacilos que en ese momento constituyen una fracción de la población del orden de 100 a 1000 veces menor, prosiguen un lento crecimiento igualando a los 30 días en número a los lactococos y llegan a ser el grupo mayoritario a partir de los 45 días de maduración.

Los leuconostoc evolucionan de forma semejante a los lactobacilos, aunque llegan a los 7-15 días a su máximo, que es del orden de $1,2 \cdot 10^8$ ufc/g (Massó, 1974; Núñez y Martínez Moreno, 1976 y Ordóñez y col., 1978a).

El recuento de leuconostoc, lactobacilos y lactococos alcanza un máximo a los 7 días de maduración en el queso Torta del Casar, experimentando seguidamente una disminución gradual hasta el final de la maduración (Poulet y col., 1991).

En el queso de La Serena se observa de la cuajada al queso de dos días un incremento de una unidad logarítmica para los lactobacilos y leuconostoc. Los lactococos, lactobacilos y leuconostoc alcanzan valores

máximos a los 15 días del orden de 10^8 - 10^9 . En los siguientes estadíos los niveles permanecen constantes y disminuyen ligeramente durante el segundo mes de la maduración (Fernández del Pozo y col., 1988a, 1989).

Las medias de los recuentos de las bacterias ácido lácticas en el queso Feta aumentan significativamente en los 7 primeros días y generalmente muestran cambios numéricos ligeros a lo largo de la maduración (Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993).

Tabla 10.- Evolución del número de bacterias lácticas en leche (L), cuajada (C) y a lo largo de la maduración en quesos elaborados con leche cruda de oveja.

				Días de maduración									
QUESO	género	L	C	1	2	7	15	30	45	60	90	120	180
IDIAZABAL (1)	Lc	4,69	5,69	8,44	-	-	8,11	7,55	-	7,20	6,93	6,65	6,32
	Lb	4,30	5,73	7,40	-	-	7,00	6,63	-	6,42	6,38	6,37	6,37
	Le	3,65	5,38	8,30	-	-	6,83	6,59	-	6,59	6,60	6,59	6,45
MANCHEG O (2)	Lc	6,70	7,97	-	-	9,45	9,51	8,63	8,08	8,26	7,48	-	-
	Lb	5,34	5,95	-	-	7,26	7,97	8,34	8,30	8,34	8,11	-	-
	Le	4,00	5,67	-	-	7,30	7,32	6,94	7,0	7,48	6,90	-	-
TORTA DEL CASAR (3)	Lc	6,16	8,05	-	-	9,74	9,06	8,24	8,00	6,90	-	-	-
	Lb	4,12	5,84	-	-	8,80	8,79	8,09	7,91	7,03	-	-	-
	Le	5,46	7,80	-	-	9,27	9,07	8,23	7,91	6,35	-	-	-
RONCAL (4)	Lc	6,1	-	8,4	-	-	-	9,1	-	9,3	9,3	-	-
	Lb	4,3	-	5,7	-	-	-	6,0	-	6,8	7,6	-	-
LA SERENA (5)	Lb	5,73	7,60	-	8,86	-	9,26	9,02	8,87	8,54	-	-	-
	Le	4,81	7,11	-	8,28	-	8,62	8,52	8,44	8,16	-	-	-
FETA (6)	Lc	6,66	-	-	-	8,68	8,02	-	7,55	-	-	6,45	-
	Lb	6,55	-	-	-	8,73	7,97	-	7,57	-	-	7,61	-

Los datos se expresan en logaritmos de unidades formadoras de colonias por mililitro de leche (log ufc/mL) y por gramo de cuajada o queso (log ufc/g).

Lc- Lactococos; Lb- Lactobacilos; Le- Leuconostoc.

(1) Pérez-Elortondo y col., 1993 a y b.

(2) Núñez y Martínez-Moreno, 1976.

(3) Pouillet y col., 1991.

(4) Ordóñez y col., 1980.

(5) Fernández del Pozo y col., 1988a.

(6) Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993.

1.4.5.- Funciones

1.4.5.1.- Producción de ácido láctico y disminución del pH

La principal función de las bacterias lácticas es fermentar la lactosa y otras sustancias generando ácido láctico y compuestos aromáticos (Lenoir, 1985; Bengoechea, 1989; Hernández, 1989; Gómez y Peláez, 1990; Axelsson, 1993).

La producción de ácido láctico reduce el pH del queso durante los primeros estadios de la maduración a $5 \pm 0,4$ dependiendo de la variedad de queso (Farkye y Fox, 1990).

Las consecuencias de la producción de ácido láctico y de la disminución del pH han sido descritas por Fox y col. (1990):

- Favorece la formación de la cuajada por enzimas coagulantes y la retención del cuajo.

La coagulación de la leche, que se traduce por la formación de un gel, es el resultado de las modificaciones fisicoquímicas que se producen a nivel de las micelas de caseína (Brule y Lenoir, 1990).

Los principales artífices de la proteólisis de la caseína son los enzimas coagulantes: cuajo, enzimas microbianos y enzimas nativos de la leche (Visser, 1977).

El cuajo es el enzima coagulante mejor conocido. Se obtiene, principalmente del estómago de los rumiantes lactantes, aunque debido a la escasez que existe, se está potenciando el empleo de proteinasas ácidas microbianas de *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* y *Endothia parasitica* y de enzimas coagulantes vegetales (*Cynara cardunculus*) (Fernández-Salguero y col., 1991).

El cuajo del estómago de vaca está constituido por quimosina y pepsina, la proporción de quimosina es mayor (85% de actividad coagulante) en las terneras más jóvenes y disminuye con la edad (De Jong, 1990).

La coagulación de la leche inducida por el cuajo es un proceso constituido por dos etapas. En la primera, el cuajo activa la hidrólisis específica de la κ -caseína dando lugar a dos fracciones: para- κ -caseína (cadena de 105 aminoácidos) y un macropéptido de 64 aminoácidos (Mc Mahon y col., 1984). La fase secundaria se deriva de que la proteólisis de la κ -caseína reduce la estabilización estérica de las micelas dando lugar a su agregación en presencia de calcio y a temperaturas de 20 °C (López-Fandiño, 1992).

Unicamente del 3 al 6 % de todo el cuajo adicionado a la leche constituye el cuajo residual retenido en la cuajada, el resto es arrastrado con el suero (Fox y col., 1993). La quimosina del cuajo residual ejerce un importante papel en la maduración produciendo la hidrólisis de la α_{s1} -caseína en los fragmentos 1-23 y 24-199. El primero contribuye a la fracción de nitrógeno soluble y es posteriormente roto por proteinasas de la pared de las bacterias ácido lácticas en fragmentos más pequeños. A continuación actúan otras peptidasas liberando péptidos pequeños y aminoácidos (Exterkate y Alting, 1995). La quimosina es también capaz de romper la β -caseína, pero esta actividad es más baja que en el caso de la α_{s1} -caseína.

El calentamiento de la cuajada y el pH de la leche y de la cuajada en el momento del desuerado son factores determinantes en la fijación de las enzimas del cuajo. A menor pH, más cantidad de cuajo queda retenido. La influencia de la acidificación es consecuencia del efecto sobre la actividad de la quimosina. El pH óptimo de ésta se sitúa según algunos autores en torno a 5 (Choisy y col., 1990), mientras otros afirman que es de 5,5 y que presenta un máximo de estabilidad en el intervalo de pH 5-6 (Brule y Lenoir, 1990).

El aumento de la velocidad de coagulación por descenso del pH se acompaña, hasta que disminuye por debajo de 6, de un aumento de la velocidad de endurecimiento del gel.

- Afecta a la actividad de la plasmina.

La plasmina es una proteasa alcalina nativa de la leche que aparece asociada a la micela de caseína. Ejerce su actividad proteolítica principalmente sobre las caseínas β y α_{s2} (Miranda y Gripón, 1986). Su pH óptimo es de 7,5-8 (Shanani y col., 1973) y a pH inferiores a 5,0 o superiores a 9,0 pierde la estabilidad (Kaminogawa y Yamauchi, 1972).

- Provoca la sinéresis (drenaje del suero) de la cuajada mediante la disminución progresiva del pH.

El desarrollo de acidez acelera la sinéresis de la cuajada, lo que afecta a la composición del queso y por consiguiente a la calidad del mismo.

- Solubiliza el calcio y fosfato coloidal.

El calcio y fosfato presentes en la micela de la caseína juegan un papel fundamental en la coagulación de la leche por el cuajo. La adición de calcio reduce el tiempo de coagulación, al aumentar la agregación de las micelas por la neutralización de residuos cargados negativamente.

La disminución de pH provoca la solubilización de calcio y fosfato desestabilizando las micelas e influyendo, en gran medida, en la estructura y textura de los quesos. Así, mientras cuajadas con pH

bajo dan como resultado quesos con texturas quebradizas, cuajadas con un pH alto tienden a producir texturas elásticas (Lucey y Fox, 1993).

- Modifica el grado de retención de la sal.

La sal ejerce diversas funciones en el queso (Guinee y Fox, 1987):

- Produce cambios en el sabor y promueve la sinéresis de la cuajada.
- Reduce la actividad de agua de los quesos lo que afecta directamente a la actividad de las enzimas nativas de la leche, del cuajo y de las bacterias.
- Dificulta el crecimiento de bacterias, levaduras y algunos mohos (Fernández-Salguero y col., 1987).
- Influye en el tiempo de maduración y en la calidad del queso.

La sal y el pH actúan de forma sinérgica en el desarrollo de estas funciones siendo la cantidad de sal retenida en la cuajada proporcional al aumento de pH.

- Influye en la vida útil del queso.

Las distintas variedades de queso poseen tiempos diferentes de vida útil dependiendo del pH y la actividad de agua.

Un aumento del contenido de agua en la cuajada provoca mayor cantidad de lactosa y ácido láctico y por consiguiente una disminución del pH. La acción conjunta de la actividad del agua y del pH no garantiza la estabilidad conjunta del queso. Su peculiar situación entre alimentos estables, de humedad intermedia y alimentos perecederos permite el desarrollo de ciertas transformaciones del sustrato y por lo tanto del afinado (Weber y Ramet, 1990).

- Previene el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos.

Esta inhibición se produce mediante la disminución del pH y la producción de distintas sustancias que se vierten al medio: bacteriocinas (nisina y otras), ácidos sin disociar, dióxido de carbono, agua oxigenada y otros compuestos de bajo peso molecular (Rúa y col., 1993).

Debido a esta capacidad, las bacterias lácticas se añaden como conservantes en muchos alimentos (Silla, 1989), aunque su explotación a nivel comercial se ve limitada por la posible producción de olores y sabores anómalos al combinar distintas cepas bacterianas (Lawrence y col., 1976).

- El lactato, formado a partir de la lactosa, sigue una evolución variable según el tipo de queso.

En el queso Emmental, el ácido láctico es parcialmente metabolizado durante el afinado por las bacterias propiónicas estabilizándose a continuación.

En los quesos de pasta blanda, los mohos degradan rápidamente los lactatos.

En la mayoría de los quesos de pasta prensada no cocida y cocida, el lactato de calcio formado a partir del calcio retenido en la cuajada produce una desacidificación y un aumento del pH (Weber y Ramet, 1990).

1.4.5.2.- Producción de sustancias sápidas y aromáticas

Ciertas bacterias lácticas transforman el ácido láctico, los citratos, lactatos, proteínas y grasa en ácidos volátiles: propiónico, acético, butírico, caproico y cáprico que, junto a ciertos aminoácidos y otros productos de la hidrólisis de proteínas, influyen en el sabor y aroma del producto final (Bengoechea, 1989; Brito, 1990).

La fermentación de la lactosa y de los lactatos durante la maduración interviene de forma notable sobre las características organolépticas de los quesos. Por ejemplo, los ácidos propiónico y acético participan en el aroma de los quesos de pasta cocida y dichos ácidos junto con el CO₂ intervienen en el afinado de los quesos Emmental y Gruyère, entre otros (Choisy y col., 1990).

En muchos tipos de quesos se han detectado sabores amargos a lo largo de la maduración (Stadhouders y col., 1983; Calvo, 1990). Al principio se pensó que eran debidos a la acción del cuajo sobre la caseína y que los estreptococos no tenían ningún papel significativo en la aparición de este defecto (Lowrie y col., 1972). Estudios más recientes han sugerido que las enzimas del cuajo producen péptidos de alto peso molecular no responsables del amargor; estos péptidos son hidrolizados por enzimas de las bacterias lácticas para producir péptidos más pequeños y aminoácidos que producen este desagradable sabor (Lawrence y col., 1976; Griffith y Hammond, 1989; Steele y Ünlü, 1992). Se ha demostrado que algunos de los componentes que provocan estos aromas y sabores no deseados se producen como consecuencia de reacciones entre grupos dicarbonilos y aminoácidos. La disminución en número de las LAB coincide con un mayor desarrollo del aroma del queso, lo que indica que éste se origina por la acción de las enzimas bacterianas liberadas durante la lisis de las propias bacterias (Reiter y Sharpe, 1971; Lawrence y col., 1976; Brito, 1990).

Los factores metabólicos de las LAB que tienen una importancia primordial en el desarrollo del sabor son (Steele y Ünlü, 1992):

- La capacidad para disminuir el potencial de oxidación-reducción.
- Los enzimas proteolíticos que poseen.

- La tasa de autólisis de las bacterias.
- Los nutrientes liberados al medio en la autólisis.
- La presencia de enzimas lipolíticos.

Se ha visto que la utilización de un espectro estrecho de enzimas proteolíticas da como resultado un conjunto de sabores y aromas no deseables, sin embargo una mezcla más amplia de enzimas producidas por un complejo de bacterias soluciona este problema (Broome y col., 1990).

En general, cabe señalar, que para controlar el desarrollo de sabores extraños se debe seleccionar con sumo cuidado la combinación y la proporción de cepas bacterianas que se adicionan como cultivo iniciador (Brito, 1990).

1.4.5.3.- Proteolisis

Las bacterias lácticas poseen un sistema proteolítico que proporciona una fuente de aminoácidos imprescindible para estimular su propio crecimiento.

Las LAB son nutricionalmente complejas ya que necesitan para su metabolismo además de una fuente de carbono, varios aminoácidos. Se ha comprobado en medios sintéticos, que es necesario proporcionarles un mínimo de seis aminoácidos y tres vitaminas para que se puedan multiplicar (Terzaghi y Sandine, 1975).

En la leche, la fuente de nitrógeno disponible está principalmente en forma de proteínas y péptidos (Gripon y col., 1991). Las proteasas y peptidasas de las LAB actúan hidrolizando las caseínas y vertiendo al medio los aminoácidos que ellas mismas necesitan (Abdel Baky y col., 1986) para, liberar, a través su metabolismo los compuestos que provocan la maduración y las características organolépticas finales de los quesos.

Tabla 11.- Concentración de aminoácidos presentes en leche y requerimientos de las bacterias del género *Lactococcus* para alcanzar un crecimiento máximo (Law y col., 1976; Shankar, 1977; Thomas y Mills, 1981).

Aminoácido	Leche	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>
Glu	35,9	77	87	70
Leu	1,2	41	37	32
Ile	0,8	33	30	32
Val	2,6	27	30	41
Arg	1,6	37	36	39

Cys	0	-	-	27
Pro	8,8	-	-	38
His	2,8	23	24	14
Phe	-	21	-	6
Met	0	22	21	11

Los resultados se expresan en microgramos por mililitro.

1.4.6.- Metabolismo

1.4.6.1.- Metabolismo de la lactosa

Los distintos géneros y especies de LAB utilizan varias rutas metabólicas para la transformación de los carbohidratos en lactato (Gripon y col, 1991). La utilización de una u otra vía no es únicamente función de las características genéticas de las especies, sino que éstas se ven a su vez influidas por las condiciones del medio, y son capaces de adaptarse y cambiar su metabolismo ante distintas situaciones (Axelsson, 1993).

Se distinguen dos tipos de fermentación láctica: homoláctica, en la que se forma únicamente ácido láctico y rinde 2 ATPs por mol de lactosa fermentada y heteroláctica en la que se transforma sólo la mitad de cada molécula de lactosa en ácido láctico produciendo 1 ATP.

Los lactococos son homofermentativos (figura 1). La lactosa penetra en la célula por el sistema de la fosfoenol piruvato-fosfotransferasa (PEP/PTS) donde la lactosa-fosfato es hidrolizada a glucosa y galactosa por la enzima fosfo- β -galactosidasa (Thomson, 1980). La glucosa entra en la vía glicolítica, y la galactosa 6-fosfato es metabolizada a través de distintos derivados de la tagatosa a dihidroxiacetona-fosfato utilizando, previa conversión a gliceraldehído 3-fosfato, la vía de la glicolisis (De Vos y Simmons, 1988). Se ha demostrado que los genes que codifican los enzimas implicados en la vía de la tagatosa están ligados a plásmidos (McKay, 1983). Por medio de esta vía el piruvato se reduce a lactato y se regenera NAD^+ necesario para continuar la fermentación.

Aunque normalmente el lactato es el único producto obtenido, cuando los lactococos crecen en presencia de galactosa, maltosa o con bajos niveles de glucosa, se forman otros productos del metabolismo del piruvato además de lactato: formiato, etanol y acetato (Fordyce y col., 1984).

En los *Leuconostoc* (figura 1) la lactosa posiblemente penetra en la bacteria por una permeasa, en el interior es hidrolizada a glucosa y galactosa. La galactosa se metaboliza por la ruta de Leloir a glucosa 1-

fosfato mientras que la glucosa sigue la vía de la fosfocetolasa (Cogan, 1987). Se obtienen como productos finales etanol, lactato y CO₂ a partir de la descarboxilación del fosfogluconato (Rocabayera, 1991).

El transporte de la lactosa en los lactobacilos termófilos y *Streptococcus thermophilus* no está del todo definido. En un principio se pensó que se realizaba tanto por el sistema PEP/PTS como por una permeasa ya que las bacterias poseían los enzimas fosfo- β -galactosidasa y β -galactosidasa (Premi y col., 1972). Estudios más recientes parecen indicar que los lactobacilos sólo poseen β -galactosidasa y en este caso el transporte se realizaría únicamente a través de permeasas (Hickey y col., 1986).

Las distintas especies termófilas de lactobacilos se comportan de diferente manera, así mientras *Lactobacillus helveticus* es capaz de utilizar la galactosa, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y la mayoría de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* la excretan al medio y únicamente metabolizan por la vía de la glicolisis la glucosa que resulta de la hidrólisis de la lactosa (Turner y Martley, 1983). Las cepas de *Lactobacillus acidophilus* utilizan la lactosa pero son incapaces de multiplicarse rápidamente en leche, debido a la naturaleza inducible de la enzima β -galactosidasa. Por ello, es en presencia de otros carbohidratos como la glucosa o la fructosa cuando se ve estimulada la producción de ácido (Srinivas y col., 1990).

Algunas especies de lactobacilos mesófilos entre los que se encuentran *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*, muy comunes en los quesos, son responsables de la isomerización de L-lactato a D-lactato y dan lugar a mezclas racémicas. Se cree que la mayoría de las cepas de *Lactobacillus casei* poseen la enzima fosfo- β -galactosidasa, mientras que *Lactobacillus plantarum* sólo tiene β -galactosidasa, esto explica que en el primer caso el sistema de transporte de la lactosa sea vía fosfotransferasa mientras que en el último se realice por una permeasa (Fox y col., 1990).

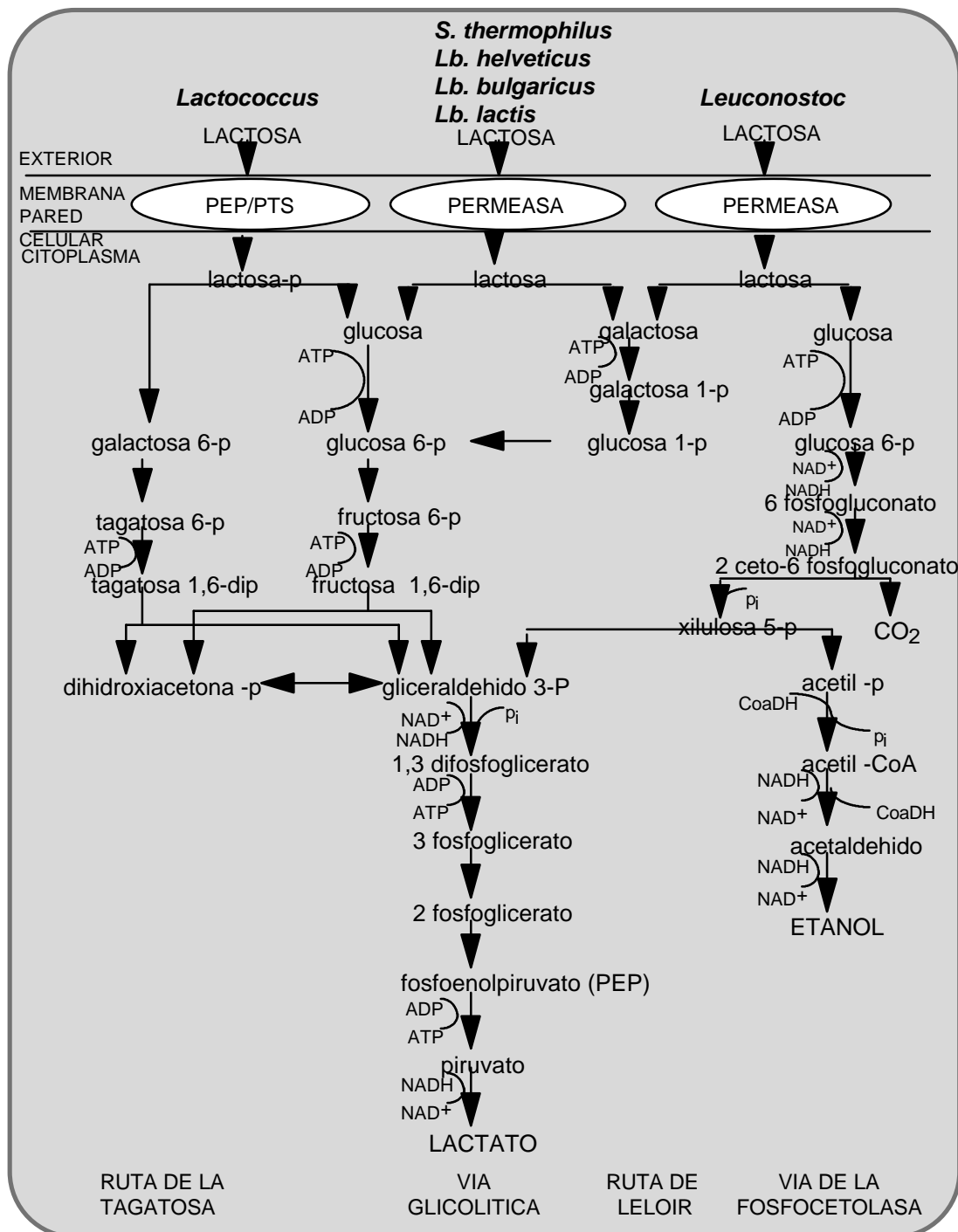


Figura 1.- Ruta del metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas (Axelsson, 1993; Desmazeaud y Roissart, 1994). *Lb.*- *Lactobacillus*. *S.*- *Streptococcus*.

1.4.6.2.- Metabolismo del citrato

La concentración de citrato en leche es pequeña (8 mM), sin embargo su metabolización es importante ya que está considerado como el principal precursor de aromas (figura 2). A partir del citrato se producen distintos compuestos como el diacetilo, la acetoina y el 2,3 butilenglicol que contribuyen de manera decisiva al aroma y sabor del queso (Cogan, 1981). También se desprende CO_2 , responsable de la formación de los ojos (Desmazeaud, 1991).

El citrato no se utiliza como fuente de energía pero sí se metaboliza muy rápidamente en presencia de una fuente de carbono. La capacidad de fermentar citrato es inestable y está ligada a plásmidos (Kempeler y McKay, 1979), por ello no todas las LAB lo pueden utilizar.

Lactococcus lactis subsp. *diacetylactis* posee una permeasa codificada por un plásmido que co-transporta el citrato y un protón siendo el producto final de la degradación diacetilo. La eficacia y el rendimiento dependen de las condiciones de cultivo (Divies, 1991). Especies de *Leuconostoc* ssp. producen en condiciones normales α -acetolactato y, diacetilo cuando la acidez del medio es baja. Algunas especies de lactobacilos mesófilos también rinden moléculas aromáticas (Botazzi, 1993).

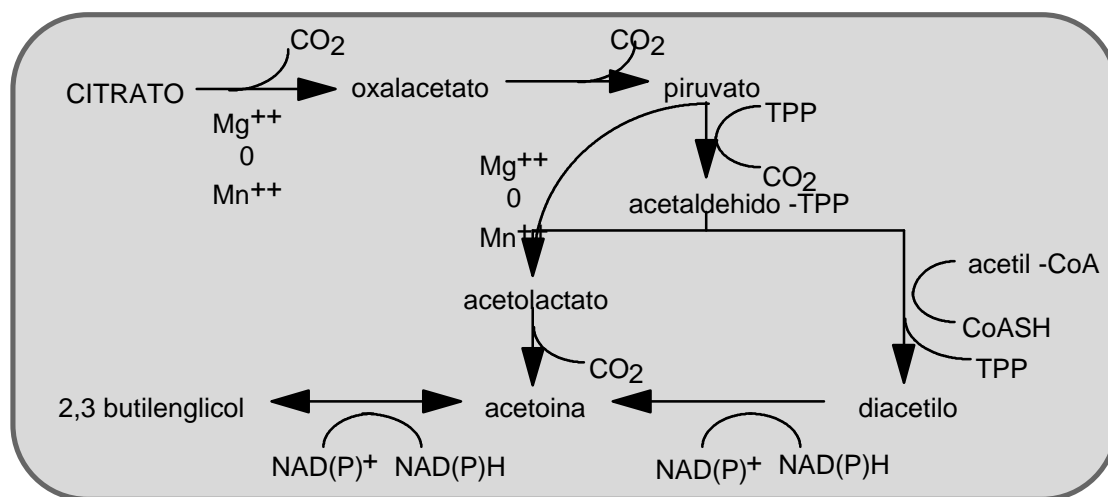


Figura 2.- Vía del metabolismo del citrato de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Leuconostoc* ssp (Axelsson, 1993; Desmazeaud y Roissart, 1994).

1.4.7.- Utilización de las Bacterias Lácticas como cultivos iniciadores

Tradicionalmente, la transformación de la lactosa en ácido láctico dependía de la contaminación inicial de la leche con bacterias lácticas procedentes del entorno.

En la industria quesera actual, interesa que la fermentación sea rápida y segura, por ello se inocula la leche con cepas seleccionadas, que constituyen el fermento y permiten la producción de sustancias aromáticas deseables, un desarrollo controlado de la acidez y la uniformidad del producto (Chapman y Sharpe, 1987). Es necesario diferenciar el papel de los fermentos según se elaboren los quesos con leche pasteurizada o cruda. En el primer caso, junto a bacterias indeseables o patógenas se destruyen las bacterias lácticas indispensables para la fabricación del queso, siendo necesaria la adición de cultivos iniciadores. En los quesos fabricados con leche cruda el empleo de fermentos permite una cierta homogeneidad del producto final sin eliminar la flora autóctona que distingue a cada tipo de queso (Bengoechea, 1989; González-Crespo y Mas, 1993).

Las características principales que se requieren para un fermento son (Cox, 1977):

- Contener una tasa adecuada de microorganismos capaz de producir la cantidad necesaria de ácido láctico a partir de la lactosa de la leche.
- Provocar los cambios deseados durante la fabricación y maduración de los quesos bien de forma directa, mediante la producción de compuestos como consecuencia de su metabolismo, o bien indirectamente, regulando la presencia de otros microorganismos (Rúa y col., 1993).
- Estar libre de contaminación por levaduras, mohos, bacterias extrañas y bacteriófagos (excepto si son cepas que portan fagos intencionadamente).

Los bacteriófagos constituyen una de las principales causas de fallos en la fermentación y ocasionan graves pérdidas. Los fagos actúan reconociendo un receptor en la pared celular y adsorbiéndose a ella, seguidamente inyectan su genóforo dentro de la bacteria hidrolizando el DNA bacteriano. Posteriormente utilizan el metabolismo de la bacteria para construir nuevos fagos que acaban lisando las células.

Existe poca información sobre el nivel de fagos que causa problemas en la elaboración de los quesos. Se sabe que la contaminación del propio cultivo es más importante que la de la leche. A partir de un nivel inicial bajo, de 5 a 5.000 fagos/mL de leche, la producción de ácido se ve influida significativamente (Cogan y Hill, 1993).

Algunas LAB desarrollan mecanismos para resistir el ataque de los fagos. Estos mecanismos son codificados por plásmidos y se transfieren de una célula a otra. Los más conocidos son: adsorción, restricción-modificación, infección adsorativa e inmunidad lisogénica (Mañra-Mäkinen y Bigret, 1993).

- Ser resistente a sustancias inhibitorias que pueden estar presentes en el medio.

Existen dos sistemas inhibitorios en la leche que son activos frente a los lactococos ya que provocan la aglutinación de las bacterias, son el sistema de la lactoperoxidasa y el sistema tiocianato-peróxido de hidrógeno (Thunell y col., 1984). Estos sistemas no son inhibitorios para todas las cepas de Lactococos e incluso algunas se ven estimuladas.

El peróxido de hidrógeno habitualmente ejerce un efecto tóxico, la adición de niveles de 5 µg/mL inhibe el crecimiento de los lactococos y se ha sugerido que una excesiva aireación de la leche puede producir suficiente peróxido para interferir con la producción de ácido por parte de los microorganismos del fermento (Lawrence y col., 1976).

Por otra parte, el propio metabolismo de las LAB produce H₂O₂ cuya vía de eliminación es por una NADH peroxidasa. Muchas veces se produce un desequilibrio entre la síntesis y la degradación según la especie bacteriana y el sustrato glucídico disponible, acumulándose H₂O₂. Este ejerce entonces un efecto autoinhibitorio sobre el propio fermento (Béliard y col., 1991).

La presencia de antibióticos en la leche, debido al tratamiento de la mastitis y otras enfermedades del ganado puede provocar retrasos e inhibición de las fermentaciones al interferir en el metabolismo de las bacterias del fermento (Núñez, 1985).

Otras sustancias inhibitorias de las LAB pueden ser: D-Leucina, aldehídos, cetonas o tioles.

Los fermentos se clasifican en la industria quesera en tres categorías: individuales, múltiples y mixtos (constituidos por mezclas de cepas) (Tamine, 1978). Los dos primeros se componen de cepas bien definidas, mientras que el último es de composición no definida.

La utilización de fermentos individuales, normalmente con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, conduce frecuentemente a defectos en el sabor (Martley y Lawrence, 1972; Broome y col., 1990), debido a la aparición de péptidos amargos liberados a partir de la caseína por las proteinasas de la pared celular (Visser y col., 1983). Además es necesaria la rotación de cepas para controlar la infección por fagos.

Los cultivos iniciadores múltiples están constituidos por un número conocido de cepas individuales. La pareja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se utiliza frecuentemente.

Los cultivos iniciadores mixtos son una combinación de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* / *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y otras bacterias lácticas mesófilas: *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Lawrence y col., 1976).

El empleo de estos dos últimos tipos de fermentos disminuye el problema de la aparición de los péptidos que dan sabor amargo y dificulta la acción de los bacteriófagos. En estos fermentos los fagos líticos coexisten con las cepas bacterianas y están bajo una continua presión que selecciona a las cepas más resistentes: cuando un fago exógeno infecta el cultivo iniciador, éste se recupera rápidamente debido a la multiplicación de las cepas resistentes (Lodics y Steenson, 1990; Rocabayera, 1991).

Los cultivos también pueden ser una mezcla definida de cepas de distintas especies (Núñez, 1985). Estos cultivos se clasifican según las especies productoras de aromas que contienen en cuatro tipos (Cogan y Daly, 1987):

- Tipo B o L: con *Leuconostoc* ssp. como único productor de CO₂ y aroma, en combinación con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.
- Tipo D: contiene dos cepas productoras de ácido (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) y *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* como único productor de aroma.
- Tipo BD o DL: son una combinación de los dos anteriores con dos cepas cuya misión es la producción de ácido láctico (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) y otras dos cepas para la producción de aromas (*Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y *Leuconostoc* ssp).
- Tipo O: no contiene cepas productoras de aroma. Están constituidos por una o varias cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Tabla 12.- Bacterias Acido Lácticas utilizadas como cultivos iniciadores y tipos de quesos a los que se adicionan (Chapman y Sharpe, 1987).

Bacterias lácticas	Tipos de queso
Cultivos iniciadores mesófilos (a) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc cremoris</i> <i>Leuconostoc</i> ssp.	<ul style="list-style-type: none"> - Quesos duros prensados Cheddar, Gouda, Edam. - Quesos blandos madurados Feta. - Madurados por mohos internos Roquefort, Stilton. - Madurado por mohos externos Camembert, Brie.
Cultivos iniciadores mesófilos (a) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Quesos blandos no madurados Coulommier, Cottage.
Cultivos iniciadores termófilos (b) <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Quesos tipo suizo Emmental, Gruyère. - Quesos italianos muy duros Parmesano, Romano.

Cultivos iniciadores mixtos <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	- Quesos italianos de pasta hilada Mozzarella, Provolone.
--	--

(a)- Temperatura óptima 20 - 30 °C; (b)- Temperatura óptima 37 - 45 °C

La dificultad de aislar nuevas cepas para los fermentos a partir de fuentes naturales y el hecho de que el número de cepas resistentes a fagos sea limitado ha llevado a la producción de mutantes resistentes a fagos (Lodics y Steenson, 1990), capaces de conferir determinadas características a los quesos (Lawrence y col., 1976).

Por otra parte, el interés por obtener fermentos autóctonos ha conducido a numerosos estudios para seleccionar las cepas de mayor interés tecnológico para cada tipo de queso (Núñez y col., 1981; Ramos y col., 1981; Suárez y col., 1984b; Quist y col., 1987; Medina y col., 1991; Requena y col., 1992; Litopoulou y col., 1993; Rúa y col., 1993).

1.4.8.- Sistema proteolítico

La leche contiene una cantidad insuficiente de aminoácidos y de péptidos de bajo peso molecular para garantizar el crecimiento de las bacterias lácticas, ya que, (ver apartado 1.4.5.3.) los requerimientos nutricionales de estos organismos son complejos y necesitan una fuente amplia de aminoácidos esenciales para su metabolismo (Thomas y Mills, 1981; Geis y col., 1986; Cogan y Hill, 1993).

Por medio de un conjunto de proteasas y peptidasas las bacterias lácticas son capaces de hidrolizar las proteínas de la leche para obtener los aminoácidos y péptidos necesarios para su crecimiento (Law y Kolstad, 1983; Abdel Baky y col., 1986; Calvo, 1990; Ramet y col., 1990; Steele y Ünlü, 1992).

Los productos de la degradación de las proteínas poseen otra importante función ya que, son los precursores de un gran número de sustancias: aminas, ácidos orgánicos, compuestos azufrados y CO₂, responsables de la textura, sabor y aroma de los quesos madurados (Fox, 1989; Khalid y Marth, 1990a; Smid y col., 1991; Pritchard y Coolbear, 1993; Bouton y col., 1994). Estas sustancias se liberan, a partir de los aminoácidos, por procesos de desaminación oxidativa, reductiva o hidrolítica, así como por procesos de descarboxilación (Lenoir y col., 1985; Abdel Baky y col., 1986).

Las LAB son débilmente proteolíticas comparadas con otros géneros de bacterias (*Pseudomonas*, *Proteus*, *Bacillus*..). Sin embargo, poseen un sistema proteolítico complejo tanto por el número como por la distribución de proteasas y peptidasas en la célula (Law y Kolstad, 1983; Monnet y col., 1987; Kok, 1993).

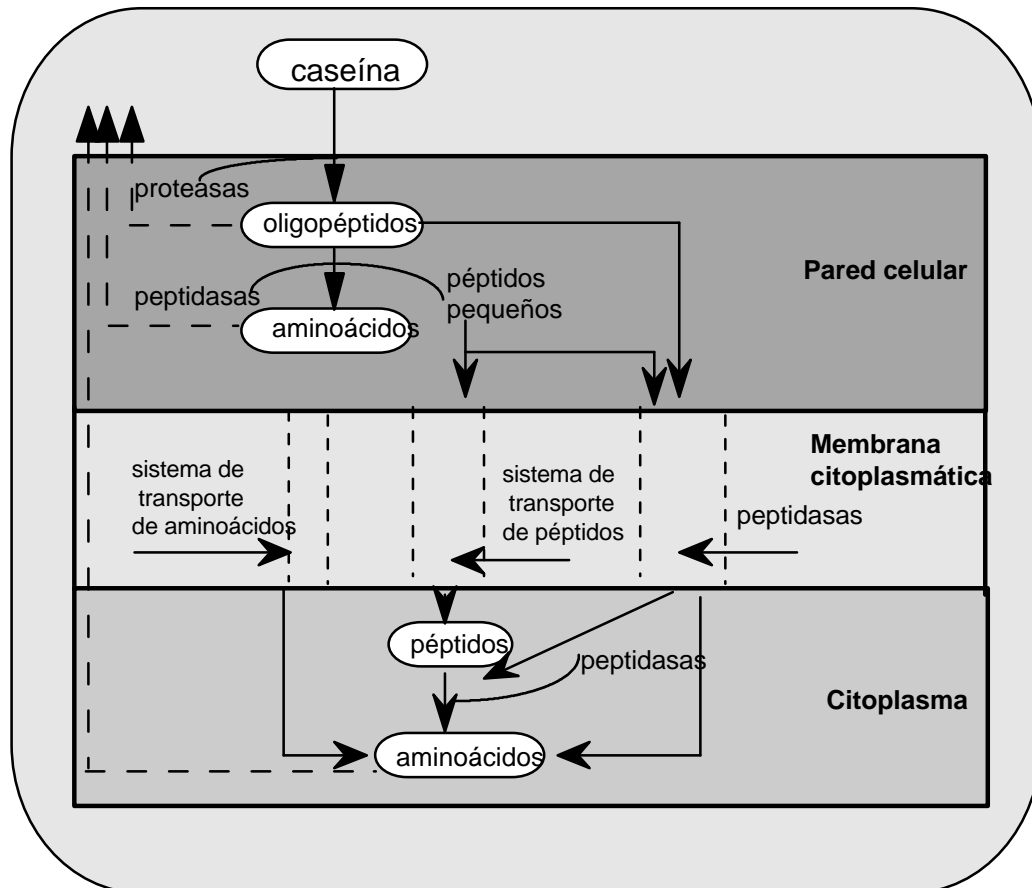


Figura 3.- Representación esquemática del sistema proteolítico de las bacterias lácticas (Botazzi, 1993).

El sistema proteolítico de las LAB se muestra en la figura 3 y se caracteriza por (Cogan y Hill, 1993; Venema, 1993):

- Proteasas asociadas a la pared celular que catalizan la hidrólisis de la caseína a oligopéptidos de 7 a 16 residuos de aminoácidos (Kamaly y Marth, 1989).
- Peptidasas localizadas fuera o dentro de la membrana. Su función consiste en hidrolizar los oligopéptidos a aminoácidos y péptidos de 5 a 6 radicales

- de aminoácidos capaces de migrar a través de la membrana citoplasmática (Ramet y col., 1990).
- Sistema de transporte para que los aminoácidos penetren en la célula.
 - Sistema de transporte para que los péptidos penetren en la célula.
 - Peptidasas citoplasmáticas o ligadas a ribosomas que hidrolizan los péptidos pequeños a aminoácidos.

1.4.8.1.- Proteinasas

Las bacterias lácticas poseen proteinasas que en la mayoría de los casos están localizadas extracelularmente, aunque también se ha visto actividad de proteinasas intracelulares (Visser, 1993), tales como endopeptidasas (Calvo, 1990) o proteinasas de membrana (Monnet y Gripon, 1994).

Las proteinasas extracelulares descritas en las LAB son enzimas ligadas a la pared celular, que se liberan al medio en ausencia de iones calcio (Thomas y Mills, 1981; Kamaly y Marth, 1989; El Soda, 1993). Esto sugiere que el calcio es necesario para estabilizar la unión de la enzima a la pared celular y para que la enzima mantenga su configuración activa (Law y Kolstad, 1983; Calvo, 1990; Pritchard y Coolbear, 1993).

Cuando la disponibilidad de aminoácidos y péptidos en el medio es alta, la bacteria reduce la síntesis de proteinasas hasta que el metabolismo celular ha utilizado esta fuente de nitrógeno externa (Law y Kolstad, 1983).

Las proteinasas más estudiadas son las del género *Lactococcus* (Cogan y Hill, 1993) debido a que se cree que pueden jugar un importante papel en el desarrollo del aroma (Kok, 1993).

Los mecanismos de regulación de la síntesis de proteinasas se han investigado en *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y se ha observado que operan tanto a nivel de la transcripción, si el aporte de aminoácidos excede de los requeridos para la síntesis de proteínas, como a nivel de traducción, cuando se produce un pequeño cambio en la concentración de aminoácidos. Este segundo mecanismo está mediado por un inhibidor del mRNA específico para una proteinasa estable (Kamaly y Marth, 1989).

Se conocen dos tipos diferentes de proteinasas de la pared celular de los lactococos (Smid y col., 1991; Pritchard y Coolbear, 1993). La proteinasa PI, hidroliza preferentemente la β caseína y posee un pH óptimo de 5,8 y una temperatura óptima de 40 °C y la proteinasa PIII con un pH óptimo de 5,4 y una temperatura óptima de 30 °C, capaz de hidrolizar las caseínas α_s1 , β y κ (Kok, 1993). Ambas proteinasas son codificadas por un gen, transportado generalmente por un plásmido (Pritchard y Coolbear, 1993; Cogan y Hill, 1993).

La información que existe sobre las proteinasas de las bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* es menor, aunque varios autores han sugerido que los lactobacilos poseen un rango más amplio de

actividad proteásica que los lactococos y que su sistema enzimático podría jugar un papel más importante en el desarrollo del aroma en algunos tipos de queso (Requena y col., 1993).

Algunos estudios han puesto en evidencia que varias especies de lactobacilos tienen proteinasas unidas a la pared celular (Law y Kolstad, 1983; Khalid y Marth, 1990a; Pritchard y Coolbear, 1993). *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* poseen una proteinasa tipo serina localizada en la superficie celular (Hegazi y Abo-Elnaga, 1987). Esta proteinasa hidroliza caseínas α_{s1} y β , aunque *Lactobacillus plantarum* degrada preferentemente caseína β (Khalid y Marth, 1990b).

Las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus* muestran una capacidad proteolítica variable hidrolizando caseínas α_{s1} y β . La utilización de unas u otras en la elaboración del queso produce diferencias importantes en las características organolépticas del producto final (Khalid y Marth, 1990a; Oberg y col., 1991).

Así mismo, en varias cepas de *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc lactis* se ha reconocido actividad caseinolítica. Esta se debe a una proteinasa asociada a la pared celular comparable, al menos en parte, a la presente en los lactococos (El-Shafei y col., 1990).

1.4.8.2.- Peptidasas

Los oligopéptidos obtenidos de la proteólisis de la caseína por acción de las proteinasas son hidrolizados posteriormente por peptidasas mediante dos vías (Pritchard y Coolbear, 1993):

- Acción exopeptidasa: libera aminoácidos y dipéptidos a partir del extremo N terminal del oligopéptido.
- Acción endopeptidasa: cataliza la ruptura de los oligopéptidos, a partir de aminoácidos localizados en el interior del péptido, a péptidos más pequeños para que puedan ser degradados posteriormente por aminopeptidasas, incluyendo di y tripeptidasas.

No se ha descrito actividad carboxipeptidasa en los lactococos (Cogan y Hill, 1993), sin embargo sí se ha sugerido en *Lactobacillus casei* aunque está todavía sin caracterizar (Abo-Elnaga y Plapp, 1987).

Existen dudas en cuanto a la localización de las enzimas en las bacterias (Tan y Konings, 1990). Se han realizado varios estudios, principalmente en lactococos, (Kamaly y Marth, 1989) y se ha descrito actividad peptidásica extracelular, intracelular y en la membrana celular (Monnet y col., 1993).

En estos microorganismos se han aislado varias peptidasas (Neviani y col., 1989; Tan y col., 1993). La mayoría de ellas (ver tabla 13) son metaloenzimas con actividad aminopeptidasa, localizadas intracelularmente. Aunque en un principio se pensó que se trataba de una aminopeptidasa con una especificidad muy amplia, estudios posteriores basados en la hidrólisis de aminoácidos p-nitroanilida han puesto de manifiesto cierta especificidad de las aminopeptidasas por el sustrato (Exterkate, 1984).

También se han caracterizado 7 exopeptidasas intracelulares (ver tabla 13) capaces de liberar prolina a partir de péptidos pequeños que contengan este residuo (Kamaly y Marth, 1989). Hay que tener en cuenta que la caseína contiene prolina (Casey y Meyer, 1985) y éste es un aminoácido esencial para el crecimiento de las bacterias lácticas.

Tabla 13.- Peptidasas aisladas de los lactococos (Monnet y col., 1993; Pritchard y Coolbear, 1993; Tan y col., 1993; Pritchard y col., 1994).

Peptidasa	Especificidad	Tipo	Referencia
Aminopeptidasas Pep C Pep N GAP I GAP II	↓ Leu/Lys_Y... Arg/Leu/Lys_Y... Asp/Glu_Y... Asp/Glu_Y...	Tiol Metalo Metalo Metalo	Neviani y col., 1989. Tan y Konings, 1990. Exterkate y Veer, 1987. Niven, 1991.
Di- y Tripeptidasas DIP I DIP II DIP III TRP I TRP II	↓ Met_X amplia amplia amplia amplia	Metalo Metalo Metalo Metalo Metalo	Desmazeaud y Zevaco, 1977. Hwang y col., 1981. Van Boven y col., 1988. Desmazeaud y Zevaco, 1977. Bosman y col., 1990.
X- Prolín dipeptidil aminopeptidasas Pep X XAP I Pep X XAP II	↓ X-Pro_Y... X-Pro_Y... X-Pro_Y... X-Pro_Y...	Serina Serina Serina Serina	Kiefer-Partsch y col., 1989. Booth y col., 1990. Zevaco y col., 1990. Lloyd y Pritchard, 1991.

Prolidasas PRD I PRD II	↓ X_Pro X_Pro	Metalo Metalo	Kaminogawa y col., 1984. Booth y col., 1990.
Prolín iminopeptidasa PIP	↓ ↓ Pro_X y Pro_X-Y	Metalo	Braankreis y Exterkate, 1991.
Endopeptidasas LEP I LEP II pep O SK 11	α _{S1} -caseína α _{S1} -caseína α _{S1} -caseína ...Y-Phe/Leu_X... ↑	Metalo Metalo Neutra	Yan y col., 1987. Yan y col., 1987. Tan y col., 1991. Pritchard y col., 1994.

El sistema peptidásico de otros géneros de bacterias lácticas es más confuso, aunque en los últimos años se han caracterizado por lo menos dos tipos de aminopeptidasas en los lactobacilos semejantes a las presentes en los lactococos (Pritchard y Coolbear, 1993).

Se ha encontrado una aminopeptidasa (metalo-enzima) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Bockelmann y col., 1992) y en *Lactobacillus helveticus* (Khalid y Marth, 1990c) y una aminopeptidasa X-Prolín-dipeptidil (enzima tipo serina) en un gran número de especies que incluyen *Lactobacillus casei* (El Abboudi y col., 1992) *Lactobacillus acidophilus* (Bockelmann y col., 1991) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Miyakawa y col., 1991)

La localización exacta de las peptidasas en los lactobacilos no se conoce todavía, aunque se cree que están preferentemente localizadas dentro de la membrana citoplasmática (Khalid y Marth, 1990a).

Las peptidasas de los leuconostoc han sido muy poco estudiadas. Se sabe que poseen un sistema peptidásico compuesto por dipeptidasas y aminopeptidasas, siendo ésta última relativamente elevada en presencia de los sustratos leucina, lisina, alanina y fenilalanina (El-Shafei y col., 1990).

1.5.- Enterococos

1.5.1.- Origen

Escherich fue la primera persona que descubrió el microorganismo que en la actualidad se conoce como *Enterococcus faecalis* y al que en 1886 denominó *Micrococcus ovalis*.

Enterococcus faecium fue identificado por primera vez en 1899 y posteriormente caracterizado en 1919 por Orla Jensen.

En el año 1900, los enterococos clásicos se propusieron como indicadores de la calidad del agua por varios motivos (Jay, 1994):

- Generalmente no se multiplican en agua.
- En las heces humanas, existen en menores cantidades que *E. coli*. Las proporciones de coliformes fecales con respecto a enterococos iguales o superiores a 4,0 son indicativas de contaminación con aguas residuales. Así, las pruebas para determinar los enterococos posiblemente reflejen más fielmente que el de coliformes fecales el número de patógenos intestinales.
- Los enterococos mueren más lentamente que los coliformes y sobreviven normalmente a los patógenos cuya presencia suelen indicar.

Actualmente, se conoce que el hábitat de los enterococos no es únicamente el intestino del hombre y los animales (origen fecal) sino que están distribuidos por otros nichos ecológicos: plantas, insectos, pájaros, suelos y alimentos sin un significado sanitario (Mundt, 1982; Hegazi, 1990a; Vanos, 1991).

Muchos alimentos contienen enterococos como parte de su flora normal. Se han encontrado niveles muy altos de estos microorganismos en productos fermentados como quesos, derivados lácteos y embutidos (Wessels y col., 1988; Hagrass y col., 1991), siendo éstos muy aptos para el consumo humano (I.C.M.S.F., 1982).

1.5.2.- Definición

Los enterococos han sido definidos como (Alais, 1985; Mundt, 1986; Hernández y Dubón, 1992a):

- Células ovoideas que se presentan aisladas, en parejas o en cortas cadenas, y frecuentemente elongadas en la dirección de la cadena. Varias especies pueden ser móviles.
- Gram positivas y generalmente catalasa negativas, pero algunas especies poseen una pseudocatalasa.
- Anaerobios facultativos y quimiorganotrofos, capaces de utilizar muchos carbohidratos por medio de su metabolismo fermentativo; el principal producto de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico.

- No forman endosporas.
- Pueden producir α o β hemólisis.
- Normalmente no reducen los nitratos y no digieren la celulosa ni la pectina.

Las principales características que las diferencian de otros géneros son las siguientes:

- Son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas (de 10 a 45 °C)
- Se desarrollan con concentraciones de ClNa del 6,5% (p/v), a pH de 9,6 y en presencia de un 4% de bilis.
- Resisten calentamientos a 63 °C durante 30 minutos, por lo que se pueden encontrar en leche pasteurizada.
- Soportan concentraciones relativamente altas de penicilina.

1.5.3.- Taxonomía

La taxonomía de las bacterias lácticas ha experimentado un gran cambio en los últimos años.

Según la clasificación del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1976) dentro del grupo de los cocos gram positivos, se encuentra el género *Streptococcus*. Este género es muy amplio e incluye a bacterias, generalmente inmóviles, no esporuladas, microaerófilas o anaerobias facultativas, gram positivas y catalasa negativas.

Estas bacterias se agrupan antigénicamente mediante las letras A, B, C, D... según el esquema de Lancefield. Al grupo serológico D de Lancefield, pertenecen los estreptococos fecales.

Dentro de los estreptococos fecales se diferencian el grupo formado por *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium* y *Streptococcus durans* que actualmente forman parte del género *Enterococcus* y el grupo formado por *Streptococcus equinus* y *Streptococcus bovis* (Pascual, 1992).

Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) fueron los primeros que propusieron el género *Enterococcus* como un género nuevo y dividieron el género *Streptococcus* en tres géneros: género *Streptococcus Sensu Stricto*, género *Enterococcus* y género *Lactococcus* (Schleifer, 1987). Esta reestructuración ha sido ya aceptada y de hecho, en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Mundt, 1986) se incorporan, al menos en parte, estos cambios taxonómicos.

La diferenciación del género *Enterococcus* se ha basado en análisis comparativos de oligonucleótidos del 16S rRNA (Ludwing y col., 1985) y en estudios de hibridación DNA-rRNA (Kilpper-Bälz y Schleifer, 1984).

Estos estudios también han revelado que *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis*) y *Enterococcus faecium* (*Streptococcus faecium*) están muy lejanamente relacionados con *Streptococcus bovis* y *Streptococcus equinus* por lo que su pertenencia a distintos géneros ha quedado confirmada (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984).

No existe consenso entre los autores al incluir las diferentes especies dentro del género *Enterococcus*. Así, mientras Mundt (1986) únicamente incluye a las especies *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus avium* y *Streptococcus gallinarum* en este género, Colman y col., (1992) añaden otras nueve especies y en las últimas revisiones aparecen hasta 16 especies adscritas al género *Enterococcus* (Hernández y Dubón, 1992a).

1.5.4.- Nivel

Los enterococos se han detectado en muchas variedades de queso en diferentes estadios de maduración, manteniendo unos niveles bastante estables, probablemente debido a su capacidad para resistir y desarrollarse en condiciones adversas (Suárez y col., 1983; Hegazi, 1989, 1990a).

En quesos elaborados con leche cruda de oveja los recuentos que se obtienen son, en general, muy altos en todos los tipos (ver tabla 14):

En el queso Idiazábal, se ha visto que los enterococos constituyen el grupo de microorganismos más abundante, después de las bacterias lácticas, con resultados medios de 10^5 y 10^6 ufc/g de queso (Pérez-Elortondo y col., 1993a). Además el proceso de ahumado no afecta al nivel de estas bacterias (Pérez-Elortondo y col., 1993b). Resultados similares se han encontrado en el queso Parmesano (Thompson y Marth, 1986).

En el queso Manchego los recuentos varían según los distintos trabajos. En algunos estudios los valores hallados han sido de 10^4 y 10^5 ufc/g (Iñigo y col., 1986). Ramos y col. (1981) han obtenido niveles de hasta $6,9 \cdot 10^6$ ufc/g en quesos de 4 meses de maduración. Ordóñez y col. (1978a) han observado que estos microorganismos son los más abundantes a partir del octavo mes de maduración, afirmación que han corroborado éste y otros autores en posteriores investigaciones (Ordóñez y col., 1988; Poulet, 1991).

Por otra parte, se ha detectado en quesos Manchegos elaborados con leche pasteurizada, recuentos de 10^4 ufc/g, lo que indica que estas bacterias pueden sobrevivir a la pasteurización (Ordóñez y col., 1978b; García y col., 1987; García de Fernando y col., 1992).

Tabla 14.- Evolución del nivel de enterococos (log ufc/g), en quesos elaborados con leche de oveja, a lo largo de la maduración.

Queso	C	días de maduración											
		1	2	4	7	15	20	30	45	60	75	90	120
Serena (1)	6,25	-	-	-	-	7,55	-	3,33	7,18	7,22	-	-	-
Torta Casar (2)	5,15	-	-	6,67	6,59	6,59	-	6,60	6,53	6,99	-	-	-
Feta (3)	3,14	-	-	-	4,87	-	5,67	-	6,18	-	5,74	-	5,72
Idiazábal (4)	4,83	6,00	-	-	-	6,20	-	6,28	-	6,32	-	6,34	6,36
Manchego (5)	-	-	5,08	-	-	-	-	5,48	-	5,00	-	4,64	4,84

C- cuajada

(1) Fernández del Pozo y col., 1988a.

(2) Pouillet y col., 1991.

(3) Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993. Fermento utilizado: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* + *Lactobacillus casei* + *Leuconostoc cremoris*.

(4) Pérez-Elortondo y col., 1993a.

(5) Iñigo y col., 1986. Datos de la fabricación industrial.

En el queso La Serena, se han encontrado valores de enterococos del orden de 10^7 ufc/g, tanto en la superficie como en el interior de los quesos. Dichos valores se mantienen bastante constantes a lo largo de la maduración (Fernández del Pozo y col., 1988a, 1989).

En el queso Feta, se han obtenido valores muy variados (entre 10^3 y 10^6 ufc/g) dependiendo de la composición de cepas en el cultivo iniciador utilizado (Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993).

En el queso Torta del Casar, el número de enterococos permanece bastante constante, en torno a $5 \cdot 10^6$ ufc/g hasta el final de la maduración (Pouillet y col., 1991). En trabajos posteriores sobre este tipo de queso se ha observado incluso una predominancia de los enterococos sobre los lactococos (Pouillet y col., 1993). Este hecho también ha sido constatado en otros quesos semejantes, como el queso portugués Serra y Serpa (Vieira de Sa y col., 1970).

Las razones que se podrían dar para esta predominancia de los enterococos son: falta de higiene en la elaboración, presencia de animales domésticos cercanos al lugar de fabricación y habilidad de estas bacterias para crecer en presencia de concentraciones salinas altas y a temperaturas elevadas (Mundt, 1986; Hegazi, 1990a).

A nivel de legislación, cabe señalar que no existe ninguna reglamentación sobre el número de enterococos permitido. Ni siquiera el Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos (I.C.M.S.F.) ofrece límites recomendados para los enterococos ya que la presencia de estos microorganismos presenta variaciones normales en relación con el tipo de alimento, temperatura, tiempo de almacenamiento... y es preciso contar con una cierta práctica para interpretar el significado de niveles concretos de estas bacterias en un determinado alimento (I.C.M.S.F., 1982).

1.5.5.- Funciones

Los enterococos tienen un gran interés tanto desde el punto de vista higiénico como tecnológico, debido a sus actividades proteolíticas y productoras de aromas además de como agentes probióticos.

1.5.5.1. Indicadores de calidad higiénica

Debido a la ubicuidad de estos microorganismos existe controversia sobre si su presencia guarda relación con una contaminación fecal de los alimentos o con intoxicaciones alimentarias.

Mossel (1987) afirma que el hecho de que los enterococos sean muy resistentes en hábitats extraentéricos determina que su presencia en los alimentos no pueda relacionarse con una contaminación de origen fecal, ni consiguientemente con la presencia simultánea de microorganismos patógenos de procedencia entérica. Esto no quiere decir que no se puedan utilizar como índices de presencia o ausencia de algunos microorganismos patógenos eliminados por las heces.

Vanos (1991) sugiere que su uso como indicador de contaminación fecal se debería limitar a determinados hábitats, por ejemplo el agua.

Este mismo autor y otros (Pascual, 1992; Tsakalidou y col., 1993; Jay, 1994) señalan que la presencia de un elevado número de enterococos en los alimentos implica prácticas higiénicas insuficientes debido a su resistencia a las temperaturas extremas, a la desecación, a detergentes y desinfectantes y al amplio margen de pH en el que pueden crecer (Mundt, 1976; Sanz-Pérez y col., 1982).

En general, cabe indicar que cuando los enterococos y, principalmente *Enterococcus faecalis* se utilizan como indicadores de la calidad higiénica de los alimentos es necesario averiguar si los aislamientos de *Enterococcus faecalis* son de las cepas que se encuentran en la vegetación y por tanto carecen de importancia higiénica, o si representan los de origen humano (Jay, 1994). Mundt (1973) estableció la diferenciación de las cepas de *Enterococcus faecalis* de origen fecal con respecto a las procedentes de la vegetación por diversas pruebas bioquímicas: reacción en leche tornasolada y fermentación de azúcares.

No se reconoce, de modo general, la capacidad de los enterococos para producir intoxicaciones alimentarias, ya que aunque en algunos brotes de intoxicaciones, los alimentos contenían alto número de enterococos, esos mismos números se han encontrado en alimentos ingeridos sin que se haya producido enfermedad (I.C.M.S.F., 1982; Varnam y Evans, 1991; Eley, 1992).

A veces se ha atribuido a los enterococos un posible papel en la formación de aminas tóxicas, debido a la presencia de descarboxilasas que transforman los aminoácidos, principalmente la tiroxina en aminas biogénicas (Alais, 1985). Sin embargo, la formación de aminas por los enterococos y otros microorganismos está todavía sin dilucidar (Iñigo y col., 1986) y es necesario evaluar qué niveles de enterococos son tolerados sin ningún riesgo de efectos nocivos por aminas vasopresoras (Mossel, 1987).

1.5.5.2.- Actividad proteolítica y producción de aromas

La tasa de los enterococos en queso es lo suficientemente alta como para considerar que ejercen algún efecto degradativo sobre los componentes de éste (Jensen y col., 1975; Ordóñez y col., 1978b). Su permanencia a lo largo de la maduración no es rara, ya que sus actividades glicolíticas son semejantes a las de los estreptococos lácticos y poseen gran capacidad de resistencia a condiciones adversas, tolerando amplios rangos de temperatura y de concentraciones salinas (Suárez y col., 1983; Hernández y col., 1989; Mas y González Crespo, 1992; Pouillet y col., 1993).

Varios autores han resaltado la importancia de estos microorganismos dentro de la flora microbiana de los quesos (Ordóñez y col., 1978a; Fernández del Pozo y col., 1989; González de Llano y col., 1992) y es muy posible que contribuyan a la maduración de éstos a través de sus actividades proteolíticas, lipolíticas y productoras de aromas (Trovatelli y col., 1987).

En distintos trabajos se ha estudiado el efecto de la adición de enterococos en la proteólisis del queso:

En el queso Cheddar se ha comprobado que la adición de *Streptococcus faecalis* con el fermento produce un aumento significativo de la proteólisis (Castberg y Morris, 1976).

Wessels (1990) confirmó la habilidad proteolítica de los enterococos, incluso en condiciones psicrotróficas y su resistencia a temperaturas de pasteurización. Así mismo, mostró que los enterococos poseen mayor capacidad proteolítica que lipolítica.

En la producción de queso Feta, la adición de *Enterococcus durans*, junto a las bacterias lácticas del fermento, produce un aumento en el nivel de aminoácidos y en la lipólisis (Kunz, 1986; Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993). Además, según Devoyod y Muller (1969), en presencia de *Enterococcus durans* se estimula el crecimiento de los lactococos.

Streptococcus faecalis var. *liquefaciens* es una especie fuertemente proteolítica. Coagula la leche, por medio de una proteasa, antes de la acidificación y posteriormente digiere el coágulo (Alais, 1985). Esta bacteria produce la liberación de oligopéptidos y aminoácidos a partir de la caseína que estimulan el desarrollo de las bacterias lácticas (Trovatelli y col., 1987; Carrasco de Mendoza y col., 1989).

Como consecuencia de su actividad proteolítica, los enterococos liberan compuestos, principalmente acetaldehído y diacetilo, que influyen notablemente en las características organolépticas del queso.

La conveniencia de introducir enterococos en los fermentos ofrece resultados contradictorios en distintos experimentos.

En algunos estudios se ha visto que la utilización de *Enterococcus faecalis* (Franklin y Sharpe, 1963; Trovatelli y col., 1987; Hagrass, 1991) o *Enterococcus durans* (Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993) redundan en una mejora del sabor y aroma del queso, obteniendo éstos mejores puntuaciones cuando son evaluados por un panel de catadores. Así mismo, se ha sugerido la utilización de *Enterococcus faecalis* como inhibidor de *Staphylococcus aureus*. Debido a fenómenos de competencia por los nutrientes y a la producción de H₂O₂ algunas cepas de *Enterococcus faecalis* impedirían la producción de la enterotoxina de *Staphylococcus aureus* (Hegazi, 1989).

Por otra parte, otros investigadores han puesto de manifiesto que la presencia de *Enterococcus faecalis* produce la aparición de sabores amargos en el queso Cheddar (Wessel y col., 1990) y el deterioro de las características de coagulación (González Crespo y Mas, 1993). Así mismo, un número muy alto de enterococos, produce defectos en las características externas del queso Gamonedo (Hernández y col., 1989) y el desarrollo de un gusto picante en el queso Provolone (Prato y Messina, 1990).

1.5.5.3.- Agente probiótico

En los últimos años se han empezado a utilizar bacterias del género *Enterococcus* como agentes probióticos para regular la microflora intestinal del hombre y los animales (Botazzi, 1993).

Los microorganismos probióticos colonizan el intestino del hospedador, adhesionándose a la superficie de las células epiteliales. Ejercen una función de barrera contra microorganismos invasores y sustancias tóxicas de la dieta, disminuyendo las infecciones intestinales (Nousiane y Setälä, 1993).

1.5.6.- Sistema proteolítico

Las proteinasas y peptidasas de los enterococos han sido menos estudiadas que las de los lactococos y otras bacterias lácticas.

Se ha aislado una proteinasa intracelular de *Enterococcus durans*. Esta enzima tiene un pH óptimo a 7 y otro a 5,5. Con concentraciones de ClNa 0,4M retiene más de un 50% de su máxima actividad y más de un 90% tras someterla a un calentamiento a 98 °C durante 1 hora. Además se ha visto que muestra especificidad por las proteínas de la leche (Castberg y Morris, 1976).

Se ha caracterizado una proteinasa extracelular de *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. Es una metalo-enzima (Hegazi, 1990b), ya que el cofactor es un catión metálico unido al apoenzima. La asociación apoenzima - coenzima forma la enzima activa dotada de propiedades catalíticas (Desmazeaud y Roissart, 1994).

Esta metalo-proteinasa de 35 kDa es capaz de hidrolizar caseína y otras proteínas (Pritchard y Coolbear, 1993).

García de Fernando y col., (1992) realizaron una experiencia utilizando tres cubas con leche. A dos se les adicionó distintas cantidades de enzima y la tercera se dejó como control. Posteriormente se midió la concentración de nitrógeno no proteico y de aminoácidos libres en los quesos elaborados con dichas leches. Los análisis mostraron un aumento del nitrógeno no proteico en los quesos experimentales respecto al control. Sin embargo, se vio que la enzima tenía poca influencia en la concentración de aminoácidos liberados. A la vista de estos resultados se ha sugerido que la proteinasa de *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* hidroliza la caseína a péptidos y polipéptidos y no libera aminoácidos libres.

También se ha comprobado que un excesivo calentamiento de la leche da lugar a una disminución significativa de la producción de enzima (Hegazi, 1990b).

1.6.- Identificación de bacterias

1.6.1.- Interés

El conocimiento de la flora microbiana de un tipo de queso, la contribución de las distintas especies y su evolución a lo largo del afinado son de una importancia primordial para la puesta a punto de una tecnología adecuada de fabricación (Ordóñez y col., 1980).

Las distintas especies bacterianas comprendidas en un género, e incluso las distintas cepas adscritas a una misma especie poseen distintas propiedades tecnológicas, sensoriales o antimicrobianas (ver tabla 15), ya que cuando degradan los componentes de la leche producen moléculas diferentes que influyen en las características organolépticas finales de los quesos (Bonassi y col., 1983; Hegazi y Abo-Elnaga, 1990).

La identificación de la flora a nivel de especie constituye por lo tanto, un paso previo para la preparación de fermentos autóctonos adecuados a cada tipo de queso (Ramos y col., 1981; Requena y col., 1992; González Crespo y col., 1993).

Tabla 15- Especies bacterianas más utilizadas en quesería y sus principales propiedades (Denis y col., 1988; Milliere y col., 1989; Broome y col., 1990; Mietton y col., 1994).

Especies bacterianas	Propiedades
----------------------	-------------

Homofermentativas mesófilas <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> . <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lb. casei</i>	+ acidificante, +rápido (excepto Prt ⁻), sensible a fagos. - rápido, aromatizante, productor de gas, sensible a fagos. ± acidificante, ± rápido, sensible a fagos, - acidificante, + actividad peptidasa. - aromatizante.
Heterofermentativas mesófilas <i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> <i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	aromatizante, productor de gas. + productor de gas y dextranos, + aromatizante. + productor de gas y dextranos, + aromatizante.
Homofermentativas termófilas <i>S. thermophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lb. helveticus</i>	- acidificante, + rápido. + acidificante, ± rápido. + acidificante, + lento, - proteolítico - termosensible, + resistente a lisozima. ± acidificante, + lento, + proteolítico, + termosensible, ± resistente a lisozima.

Lb. - *Lactobacillus*; *Lc.* - *Lactococcus*; *Le.* - *Leuconostoc*; *S.* - *Streptococcus*.

Prt⁻. proteinasa negativo.

+ si; - no; ± varía según cepas.

1.6.2.- Métodos de identificación

La taxonomía se encarga de identificar y descubrir las especies y de definir una metodología adecuada para clasificar los microorganismos según sus relaciones filogenéticas y funcionales. Para ello, recurre a los métodos de clasificación, cada día más rigurosos (Dellaglio y col., 1994).

Las técnicas más utilizadas para la clasificación e identificación de las bacterias lácticas son (Kersted y Pot., 1991):

- Observación de los caracteres morfológicos.
- Características fenotípicas y bioquímicas.
- Técnicas quimiotaxonómicas.
- Técnicas genotípicas.
- Técnicas finger-print.

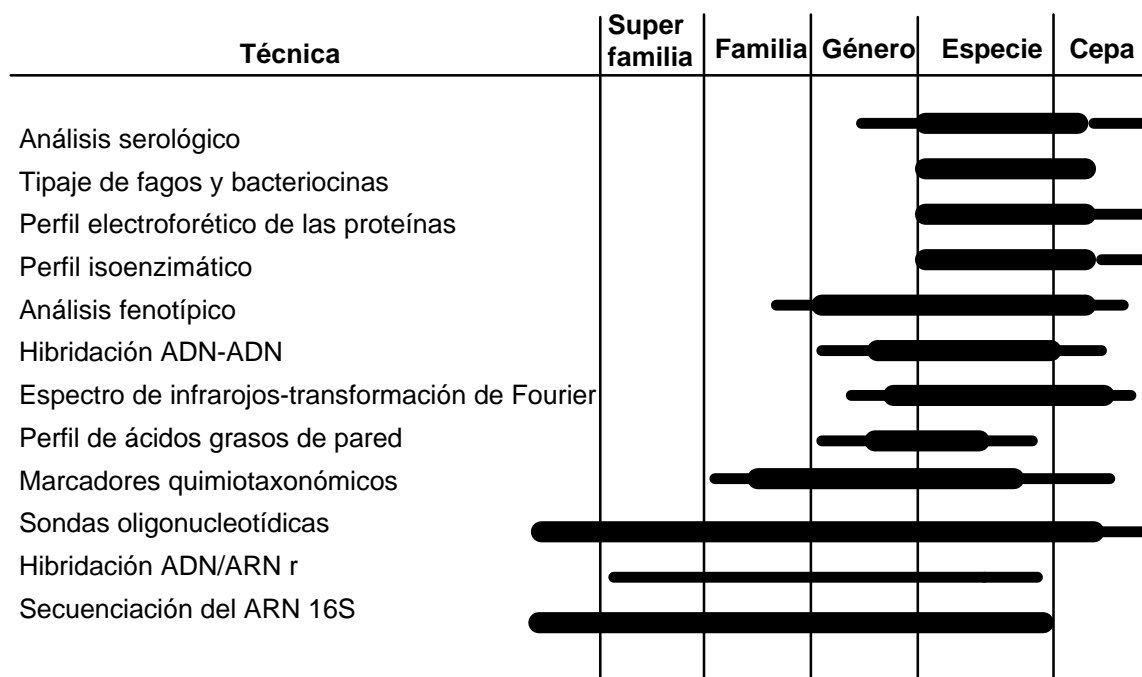


Figura 4.- Poder discriminante de los diferentes métodos utilizados para la identificación de bacterias lácticas (Curk y col., 1994).

Normalmente es necesaria la combinación de métodos para identificar una nueva cepa o para estudiar su posición filogenética exacta. La elección de la técnica depende de varios factores (Kersted y col., 1991). Los más importantes son: el nivel de identificación al que se quiere llegar (ver figura 4), la fiabilidad que se desea obtener y la disponibilidad de bancos de datos de referencia.

1.6.2.1.- Caracteres morfológicos (Dellaglio y col., 1994)

La forma de las células representa un carácter distintivo de género y especie bacteriana, aunque en algunos casos su variabilidad puede ser causa de confusión.

El diámetro celular permite apreciar la pureza de un cultivo, mientras que la longitud no es una característica fiable ya que varía según las condiciones.

La movilidad y la esporulación son caracteres utilizados normalmente pero no para clasificar las bacterias lácticas, ya que éstas no producen esporas y son inmóviles.

La presencia de inclusiones celulares, como los corpúsculos metacromáticos, es una característica distintiva de algunas especies de lactobacilos homofermentativos estrictos.

1.6.2.2.- Características fenotípicas y bioquímicas (Kersted y Pot, 1991; Axelsson, 1993)

Las características más utilizadas son:

- Crecimiento en aerobiosis o anaerobiosis, a diferentes pH, temperaturas y concentraciones de CINA.
- Crecimiento en presencia de bilis, azul de metileno, etanol y otros inhibidores.
- Configuración del ácido láctico producido al fermentar la glucosa (D-, L- o DL-).
- Producción de CO₂ en medio con glucosa y formación de acetoina a partir de glucosa o citrato.
- Producción de polisacáridos extracelulares.
- Fermentación de carbohidratos.
- Hidrólisis de la arginina, hipurato, esculina, almidón y urea.
- Tipo de hemólisis. Reducción del tetrazolio y del telurito potásico.
- Observación de la síntesis de enzimas específicos (catalasa o pseudocatalasa, fosfatasa alcalina, α -galactosidasa).
- Análisis serológico, utilizando anticuerpos frente a constituyentes de la envuelta celular.

Los criterios fenotípicos y bioquímicos presentan un poder discriminante que comprende a géneros y especies, y en menor medida a sub-especies y cepas (ver figura 4). Estos métodos son los más utilizados para la diferenciación de las bacterias lácticas (Milliere y col., 1989) y son los que se mencionan, principalmente, en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986), debido a sus aplicaciones prácticas. Sin embargo, la clasificación e identificación más precisa, sobre todo a nivel de cepa, precisa de técnicas más complejas.

1.6.2.3.- Técnicas quimiotaxonómicas (Axelsson, 1993)

- Análisis del peptidoglicano de la pared celular.
- Movilidad electroforética de las D- y L- lactato deshidrogenasas.
- Presencia y tipo de metaquinonas.
- Composición de ácidos grasos de la pared celular.

1.6.2.4.- Técnicas genotípicas (Curk y col., 1994)

- Contenido de guanina más citosina en el ADN cromosómico.

El porcentaje de guanina más citosina en el ADN es constante para un microorganismo determinado pero, varía de un microorganismo a otro. Dos especies son distintas si la diferencia de su contenido en guanina más citosina es de al menos el 5%. De todas maneras, dos cepas con el mismo porcentaje no tienen por que se obligatoriamente la misma, debido a que este valor no tiene en cuenta la combinación lineal de los nucleótidos en el ADN.

- Hibridación ADN-ADN.

Este método se aplica a bacterias muy relacionadas filogenéticamente. Se admite que dos bacterias son de la misma especie a partir de un 70% de homología entre las dos hebras que forman el heterodúplex. Una homología del 30 al 65% significa que probablemente pertenezcan al mismo género.

También se puede utilizar la hibridación ADN-ADN para la caracterización de fagos en un fermento (Lodics y Steenson, 1990).

Sin embargo, esta técnica no es muy utilizada por ser laboriosa y por no ofrecer unos resultados del todo fiables.

- Hibridación ADN-ARN.

El hecho de que los ARN m sean difíciles de extraer de las bacterias y que los resultados que se obtienen sean similares a los de la hibridación ADN-ADN hace que esta técnica sea poco utilizada.

- Secuenciación del ARN r.

El ARN r 16S posee el conjunto de características necesarias para poder ser utilizado en la identificación de las bacterias a todos los niveles taxonómicos, desde el nivel de reino al de especie.

El ARN r 16S posee una horquilla, que corresponde a las zonas más conservadas y se desplaza lentamente, lo que ha posibilitado el estudio de la evolución en largos periodos de tiempo. Otras zonas de la molécula, son más variables y permiten diferenciar organismos muy próximos filogenéticamente.

Actualmente, esta técnica es muy utilizada ya que es posible determinar las secuencias de fragmentos del ARN r, y de la molécula entera 16S por medio de una transcriptasa inversa que sintetiza un ADN complementario a partir del ARNr. Este fragmento de ADN es posteriormente secuenciado (Lane y col., 1988).

- Método PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Esta técnica permite la amplificación de un gen o parte de un gen de un número limitado de células. La enzima polimerasa copia un fragmento de ADN utilizando como iniciador pequeños oligonucleótidos. De esta manera se obtienen muchas copias de dicho fragmento que posteriormente son secuenciadas.

Este método es de los más utilizados en taxonomía bacteriana, principalmente para identificar cepas difíciles de cultivar de las que sólo se pueden extraer cantidades de ADN muy pequeñas (Saiki y col., 1988).

- Sondas oligonucleotídicas.

Una sonda es un fragmento de ácido nucleico de una sola hebra de composición conocida, que se hibrida de forma específica a las regiones complementarias del ácido nucleico de la bacteria a identificar (ARN r o una hebra del ADN). Este método permite verificar la pertenencia de una cepa a una especie o sub-especie.

Las técnicas genotípicas han permitido establecer detalles sobre las relaciones filogenéticas entre los distintos géneros de bacterias lácticas y entre éstas y otros géneros (Martínez-Murcia y Collins, 1990; Collins y col., 1991; Williams y col., 1991).

A modo de ejemplo, cabe señalar que debido a estos métodos de identificación se han diferenciado y se han incorporado a la sistemática bacteriana los géneros *Lactococcus* y *Enterococcus* (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984; Schleifer y col., 1985).

1.6.2.5.- Técnicas finger-print (Curk y col., 1994)

- Separación de las proteínas celulares por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

Una célula bacteriana puede sintetizar alrededor de 2.000 proteínas diferentes, que constituyen una importante fuente de información para su clasificación, caracterización e identificación.

La separación de las proteínas celulares por PAGE produce un perfil proteico complejo que se considera la huella de la bacteria examinada.

Esta técnica constituye un método muy sensible para diferenciar las bacterias a nivel de especie o sub-especie (Khalid y Marth, 1990b; Peterson y col., 1990; Van Den Berg y col., 1993)

Este método posee otras aplicaciones como son la detección de los péptidos hidrolizados a partir de la caseína por las bacterias (Geis y col., 1986; Hill y Gasson, 1986), y la purificación y caracterización de aminopeptidasas (Atlan y col., 1990; Tan y Konings, 1990; Tsakalidou y Kalantzopoulos, 1992a; Tsakalidou y col., 1993a).

- Estudio de los perfiles de ácidos grasos de la pared bacteriana.

El análisis de los ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa es un método rápido, sensible y selectivo, que permite la identificación de un gran número de cepas bacterianas. Una vez realizado el cromatograma, se compara la información obtenida con los perfiles de ácidos grasos disponibles en bancos de datos de referencia. Hasta el momento se han identificado 115 ácidos grasos bacterianos, lo que posibilita la caracterización de las células de forma bastante precisa (Miller, 1984).

- Espectro infra-rojo-transformación de Fourier (IRTF).

Las propiedades de absorción de las células bacterianas enteras en el infra-rojo (4.000 a 5.000 cm^{-1}) constituyen un medio rápido y sensible de identificación, ya que cada cepa posee un espectro IRTF específico y reproducible. Se basa en una comparación de los espectros obtenidos con los espectros IRTF disponibles en bancos de referencia. Este método está limitado por su dependencia de las condiciones de cultivo, que deben ser rigurosamente normalizadas.

- Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

Para aplicar esta técnica es necesario extraer el ADN cromosómico. A continuación se corta con enzimas de restricción y se hace migrar sobre un gel de agarosa. Posteriormente se transfiere sobre los soportes donde se produce la hibridación con sondas oligonucleotídicas. Esta técnica permite verificar la pertenencia de una cepa a una especie o sub-especie.

- Electroforesis en campo pulsado (PFGE).

Este método se fundamenta en las propiedades fisicoquímicas del ADN. En un campo eléctrico el ADN se orienta paralelamente a dicho campo antes de comenzar su migración, siendo la intensidad de la orientación de las moléculas proporcional a su tamaño. La electroforesis en campo pulsado se utiliza actualmente para determinar el tamaño del genoma bacteriano, comparar dos cepas por análisis de los perfiles de restricción y construir mapas del cromosoma de la bacteria.

1.6.3.- Identificación de la flora láctica en quesos elaborados con leche cruda de oveja

Como se ha mencionado anteriormente, la calidad de un queso se ve fuertemente influenciada por la flora microbiana que interviene a lo largo del período de maduración (Barcina y col., 1988), siendo necesario identificarla para poder caracterizar cada tipo de queso.

Durante los últimos 20 años se ha prestado mucho interés al estudio de las especies que intervienen en el afinado de los quesos (Pérez-Elortondo y col., 1993a). Resulta imposible enumerarlos todos, por ello, se van a señalar en este apartado algunos trabajos representativos de las especies microbianas presentes en quesos elaborados con leche cruda de oveja (tabla 16).

Tabla 16.- Frecuencias en porcentaje con respecto al total para cada género de las especies de bacterias lácticas presentes en quesos elaborados con leche cruda de oveja.

Queso	<i>Lactococcus (Lc)/ Streptococcus (S)/ Enterococcus (Ec)</i>	<i>Lactobacillus (Lb)</i>	<i>Leuconostoc (Le)</i>
Roncal (1)	<i>S. lactis</i> 100	<i>Lb. casei</i> 63,2 <i>Lb. plantarum</i> 36,8	<i>Le. dextranicum</i> 33,3 <i>Le. lactis</i> 66,7
Manchego (2)	<i>S. lactis</i> 27,5 <i>S. cremoris</i> 1,3 <i>S. diacetylactis</i> 2,6 <i>S. faecalis faecalis</i> 55,9 <i>S. faecalis liquefaciens</i> 0,4 <i>S. faecium</i> 6,6 <i>S. durans</i> 5,7	<i>Lb. plantarum</i> 17,8 <i>Lb. casei</i> 79,8 <i>Lb. brevis</i> 1,6 <i>Lb. cellobiosus</i> 0,8	<i>Le. lactis</i> 16,7 <i>Le. dextranicum</i> 83,3
Torta del Casar (3)	<i>Lc. lactis lactis</i> 20,6 <i>Ec. avium</i> 28,9 <i>Ec. faecalis</i> 31,4 <i>Ec. faecium</i> 6,2 <i>Ec. gallinarum</i> 6,7 Intermedio <i>Ec. faecalis-Ec. faecium</i> 6,2	<i>Lb. acidophilus</i> 1,2 <i>Lb. brevis</i> 10,4 <i>Lb. casei sb. casei</i> 1,2 <i>Lb. paracasei</i> 3,1 <i>Lb. rhamnosus</i> 11,7 <i>Lb. curvatus</i> 29,4 <i>Lb. murinus</i> 1,2 <i>Lb. plantarum</i> 28,2 <i>Lb. salivarius</i> 0,6 <i>Lactobacillus ssp.</i> 12,9	<i>Le. lactis</i> 2,2 <i>Le. mesenteroides dextranicum</i> 23,6 <i>Le. mesenteroides mesenteroides</i> 36,9 <i>Le. paramesenteroides</i> 34,4 <i>Leuconostoc ssp.</i> 2,9
Idiazábal (4)	<i>Lc. lactis lactis</i> 30 <i>Lc. lactis cremoris</i> 7 <i>Lc. lactis diacetylactis</i> 60 <i>Lc. raffinolactis</i> 2	<i>Lb. plantarum</i> 36 <i>Lb. casei casei</i> 55 <i>Lb. casei rhamnosus</i> 10	<i>Le. lactis</i> 100
La Serena (5)	<i>Lc. lactis lactis</i> principalmente	<i>Lb. plantarum</i> y <i>Lb. casei</i> principalmente	<i>Le. mesenteroides</i> principalmente

(1) Ordóñez y col., 1980.

(2) Ordóñez y col., 1978a.

(3) Pouillet y col., 1993.

(4) Rúa y col., 1993.

(5) Fernández del Pozo y col., 1988.

1.7.- Objetivo e interés del presente trabajo

El objetivo principal de este estudio es contribuir a la caracterización de los quesos de oveja con Denominación de Origen Roncal e Idiazábal elaborados en Navarra, prestando principal atención a la flora microbiana.

Para lograr tal fin se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Estudio de los principales parámetros fisicoquímicos y de los grupos microbianos más relevantes en la leche de partida y en los quesos de 120 días.
- 2.- Seguimiento de la evolución de los parámetros anteriormente mencionados en los quesos a lo largo del periodo de maduración.
- 3.- Identificación de las especies de bacterias lácticas: lactococos, lactobacilos y leuconostoc y de enterococos que intervienen en la maduración de los quesos.
- 4.- Determinación de las actividades enzimáticas de los enterococos.

El interés de este trabajo radica, por una parte, en la optimización del proceso de elaboración con el fin de obtener un producto bien definido y lo más homogéneo posible y, por otra parte, en la identificación y determinación de las actividades enzimáticas de la flora microbiana como paso previo para la elaboración de cultivos iniciadores autóctonos adecuados a cada tipo de queso.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1.- Toma de muestras

Para el presente trabajo se recogieron muestras de leche, cuajada y quesos de 1, 2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 150 días de maduración, de siete queserías localizadas en Navarra, tres acogidas a la Denominación de Origen Roncal y cuatro a la Denominación de Origen Idiazábal. El muestreo se llevó a cabo en dos fases, como se indica en las figuras 5 y 6.

Durante el año 1992 se realizó el primero de ellos (figura 5) para estudiar la evolución de los parámetros fisicoquímicos: pH, extracto seco y materia grasa, y microbiológicos: flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos en los quesos a lo largo del periodo de maduración; así como para el aislamiento e identificación de cepas de lactococos, lactobacilos y leuconostoc.

Con estos objetivos se tomaron muestras de cuatro queserías: dos acogidas a la D.O. Idiazábal (Q1 y Q2) y dos a la D.O. Roncal (Q4 y Q5) y se analizaron, por duplicado, en cada una de ellas 3 muestras de leche, 2 de cuajada y 3 quesos a los días 1, 2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 150 del periodo de maduración. De todas estas muestras se aislaron e identificaron 174 cepas de lactococos, 494 de lactobacilos y 204 de leuconostoc.

Adicionalmente, se aislaron e identificaron de otras dos queserías adscritas a la D.O. Idiazábal (Q3 y Q7) 89 cepas de lactococos, a partir de leche y de quesos en los mismos estadios de maduración. Por lo tanto, se identificaron un total de 263 cepas de lactococos.

En el año 1993 se llevó a cabo el segundo muestreo (figura 6) para estudiar, en la leche y en los quesos de 120 días de maduración los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos señalados anteriormente, considerándose de interés determinar la influencia que tiene la leche de partida en el producto final. Se seleccionaron los quesos de 4 meses, por ser a partir de este momento cuando los quesos con D.O. Roncal se pueden comercializar. Así mismo, se realizó el aislamiento e identificación de cepas de leuconostoc y enterococos, ya que resultaron ser dos géneros poco estudiados e importantes cuantitativamente en estos quesos.

Con estos fines se aumentó a seis el número de queserías estudiadas: tres acogidas a la D.O. Idiazábal (Q1, Q2 y Q3) y tres a la D.O. Roncal (Q4, Q5 y Q6) y se analizaron, por duplicado, en cada una de ellas 3 muestras de leche y 6 quesos de 120 días de maduración elaborados con dichas leches. Se aislaron e identificaron 260 y 282 cepas de leuconostoc y enterococos respectivamente, lo que hace un total de 464 cepas de leuconostoc identificadas. Para el análisis estadístico se utilizaron los resultados obtenidos de los análisis de leche y quesos de 120 días de ambos muestreos.

Por último, se seleccionaron al azar 40 cepas de enterococos de las aisladas a las que se efectuó un “screening” de las actividades enzimáticas y se determinaron detalladamente las actividades proteasa y aminopeptidasa de las 13 que mostraron resultados más elevados.

En total, se analizaron 32 muestras de leche, 8 de cuajada y 162 quesos.

Los quesos se elaboraron a partir de leche cruda de oveja con adición de cuajo y fermentos industriales liofilizados.

Para la fabricación de los quesos se siguió el Reglamento de la Denominación de Origen Idiazábal (B.O.E. 3-12-1993) y el de la Denominación de Origen Roncal (B.O.E. 14-3-1991) según los casos. Posteriormente se mantuvieron en la cámara de maduración de las queserías en las condiciones habituales hasta su recogida. Las muestras se trasladaron al laboratorio en neveras portátiles con acumuladores de frío, manteniendo la temperatura a 4-6 °C. Se realizaron los análisis fisicoquímicos y microbiológicos el mismo día de su recogida.

Las cepas bacterianas aisladas se mantuvieron, a corto plazo, a 4 °C en caldo Elliker (Elliker y col., 1956) de DIFCO® excepto los lactobacilos que se conservaron a dicha temperatura en MRS Broth (Man y col., 1960) de DIFCO®.

Algunas cepas se congelaron en Skim Milk (DIFCO®) (Tsakalidou y Kalantzopoulos, 1992a) a - 80 °C, hasta su posterior identificación.













MUESTRAS					
DENOMINACION DE ORIGEN	QUESERIAS	LECHE CRUDA	QUESOS 120 días de maduración	CEPAS IDENTIFICADAS	ACTIVIDADES ENZIMATICAS
Idiazábal	Quesería 1	 3 muestras	 6 quesos	46 cepas de <i>Enterococcus</i> 20 cepas de <i>Leuconostoc</i>	
Idiazábal	Quesería 2	 3 muestras	 6 quesos	42 cepas de <i>Enterococcus</i> 44 cepas de <i>Leuconostoc</i>	
Idiazábal	Quesería 3	 3 muestras	 6 quesos	52 cepas de <i>Enterococcus</i> 21 cepas de <i>Leuconostoc</i>	13 cepas de <i>Enterococcus</i> seleccionadas de un total de 40 mediante test api-zym
Roncal	Quesería 4	 3 muestras	 6 quesos	42 cepas de <i>Enterococcus</i> 34 cepas de <i>Leuconostoc</i>	
Roncal	Quesería 5	 3 muestras	 6 quesos	51 cepas de <i>Enterococcus</i> 81 cepas de <i>Leuconostoc</i>	
Roncal	Quesería 6	 3 muestras	 6 quesos	49 cepas de <i>Enterococcus</i> 60 cepas de <i>Leuconostoc</i>	

Figura 6.- Muestreo adicional realizado para el estudio del: pH, extracto seco, materia grasa, flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos en la leche y en los quesos de 120 días de maduración y para la identificación de cepas de leuconostoc y enterococos.

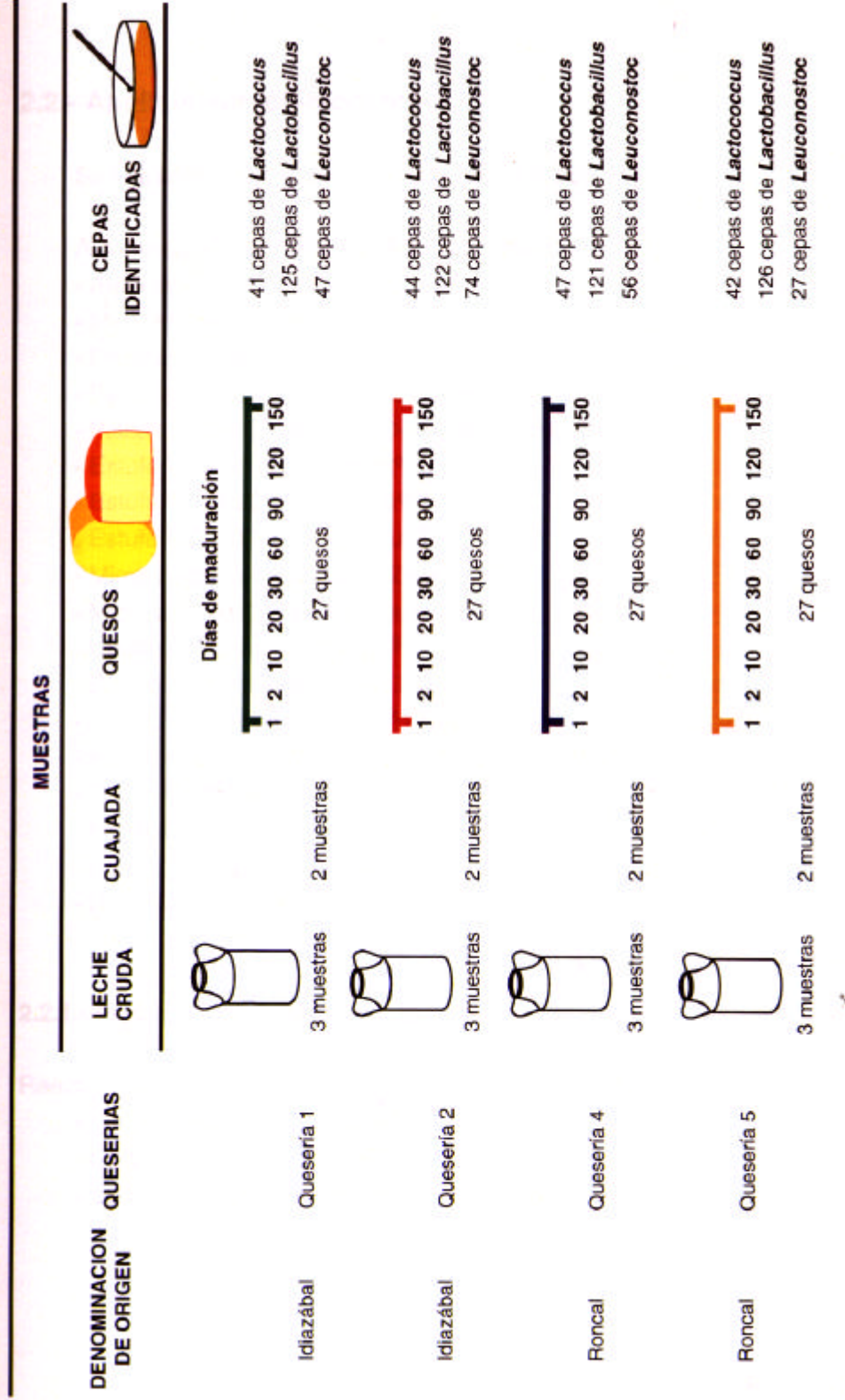


Figura 5.- Muestreo realizado para la caracterización de la evolución del: pH, extracto seco, materia grasa, flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos en los quesos a lo largo del periodo de maduración y para el aislamiento e identificación de cepas de lactococos, lactobacilos y leuconostoc .

2.2.- Análisis microbiológicos

Se analizaron por duplicado todas las muestras de leche, cuajada y queso.

A continuación se detalla el material y aparatos empleados para estos análisis:

- Autoclave Sterilclav-75 de Raype[®].
- Miniclave de Raype[®].
- Campana de flujo laminar.
- Baño termostático-Digiterm 3000542 de Selecta[®].
- Placas de Petri, diámetro 90- Industrias JLC.
- Estufa BM 500 de Memmert[®].
- Estufa 02000207 de Selecta[®].
- Estufa B 5060 KF de Heraeus[®].
- Microscopio Jenamed 2 de Zeiss[®].
- Microscopio B071 de Olympus[®].
- Cuenta colonias Anderman[®].
- Placas calefactoras IKAMAG[®] RH.
- Agitatubos New zx de UKA[®] -Technic.
- Frascos de 25, 100, 250, 500 y 1000 mL. de Schott[®].
- Tubos de ensayo.
- Pipetas.
- Eppendorf VE 1000, VE 200 y VE 100 de UKA[®] Technic.
- Balanza de Precisión Cobos[®].

2.2.1.- Procesamiento de muestras

Reactivos y aparatos:

- Agua de peptona de Difco[®].
- Citrato de Sodio, Panreac[®].
- Stomacher Lab-Blender 400.

Método:

Se tomaron 10 mL de leche con pipeta estéril y se adicionaron a 90 mL de agua de peptona al 0,1% (p/v), se realizaron diluciones decimales hasta la dilución 10^{-5} .

Para la cuajada y el queso se tomaron 10,0 gramos del centro del mismo con cuchillo previamente flameado y se homogeneizaron con 90 mL de citrato de sodio al 2% (p/v) en estomacher durante 2 minutos. Posteriormente se realizaron las diluciones decimales hasta 10^{-9} .

2.2.2.- Siembra de muestras

Para cada recuento microbiano se utilizaron tres diluciones, éstas variaron dependiendo del número de microorganismos esperado en cada recuento.

Las siembras se realizaron por duplicado, sembrando 1 mL en masa y 0,1 mL en superficie.

A continuación se expone el medio de cultivo y método empleado para cada género microbiano, siguiendo las recomendaciones del Comité Internacional de Normas para Alimentos (I.C.M.S.F., 1982) y de Pascual (1992).

2.2.2.1.- Enterobacterias

Medio y condiciones de cultivo:

Violet Red Bile Glucose Agar (Mossel y col., 1978) de Oxoid[®], pH $7,4 \pm 0,2$.

Siembra en masa. Incubación a 37 °C, 24 horas.

2.2.2.2.- Coliformes

Medio y condiciones de cultivo:

Violet Red Bile Agar (Druce y col., 1957) de Oxoid[®], pH $7,4 \pm 0,2$.

Siembra en doble capa. Incubación a 37 °C, 24 horas.

2.2.2.3.- Flora aerobia mesófila

Medio y condiciones de cultivo:

Plate Count Agar (U. S. Dept. of Health and Human Serv., 1980) de Difco[®], pH $7,0 \pm 0,2$.

Siembra en masa. Incubación a 32 °C, 48 horas.

2.2.2.4.- Lactococos

Medio y condiciones de cultivo:

M 17 Agar (Terzaghi y Sandine, 1975) de Biokar[®], pH $7,1 \pm 0,2$.

Siembra en masa. Incubación a 32 °C, 48 horas en jarra de anaerobiosis con atmósfera de CO₂ 10% y O₂ 5%, creada mediante Gas-Pack de Oxoid[®].

2.2.2.5.- Lactobacilos

Medio y condiciones de cultivo:

Rogosa SL Agar (Rogosa y col., 1951) de Difco[®] con adición de ácido acético glacial (1,32 mL/L), pH $5,4 \pm 0,2$.

Siembra en masa. Incubación a 32 °C, 48 horas en jarra de anaerobiosis con atmósfera de CO₂ 10% y O₂ 5%, creada mediante Gas-Pack de Oxoid[®].

2.2.2.6.- Leuconostoc

Medio y condiciones de cultivo:

M.S.E. Agar (Mayeux y col., 1962) de Biokar[®], pH $7,0 \pm 0,2$.

Siembra en superficie. Incubación a 32 °C, 48 horas en jarra de anaerobiosis con atmósfera de CO₂ 10% y O₂ 5%, creada mediante Gas-Pack de Oxoid[®].

2.2.2.7.- Enterococos

Medio y condiciones de cultivo:

KF Streptococcus Agar con adición de solución al 1% de cloruro trifeniltetrazolio (1 mL/100 mL) (Kenner y col., 1961) de Difco[®], pH $7,2 \pm 0,2$.

Siembra en masa. Incubación a 37 °C, 48 horas.

2.2.3.- Recuento de microorganismos

Se consideraron las placas en las que habían crecido entre 30 y 300 colonias. El número de unidades formadoras de colonias por mililitro de leche o por gramo de queso (ufc/mL o ufc/g) se determinó según la Norma UNE 34 - 805/1983 (1983) que viene dada por la siguiente fórmula (B.O.E. 8- 7-1985):

$$N^{\circ} \text{ ufc/g} = \frac{(N^{\circ} \text{ ufc } 1^{\text{a}} \text{ dilución}) + (N^{\circ} \text{ ufc } 2^{\text{a}} \text{ dilución}) \cdot 1^{\text{a}} \text{ dilución}}{1 (N^{\circ} \text{ placas } 1^{\text{a}} \text{ dilución}) + 0,1 (N^{\circ} \text{ placas } 2^{\text{a}} \text{ dilución})}$$

Se contaron todas las colonias que reunían las características descritas por los autores de los medios de cultivo.

2.3.- Análisis fisicoquímicos

Las muestras de cuajada y queso se trituraron con picadora Moulinex[®] modelo 320, las de leche se homogeneizaron a temperatura ambiente.

Todos los análisis se realizaron por duplicado el mismo día del transporte de muestras al laboratorio.

Se detallan a continuación los métodos analíticos empleados.

2.3.1.- pH

Reactivos y material:

- pH-metro ORION[®], modelo 720 A. pH/ISE Meter.
- Ultra-Turrax T 25 de IKA[®] -Labortechnik.
- Solución tampón de referencia a pH 7 y pH 4 de Crison[®].

Método:

Se determinó el pH en leche homogeneizada, en la muestra de queso y de cuajada triturada según el método de Berdague y Grappin (1987).

2.3.2.- Materia grasa

Reactivos y material:

- Acido sulfúrico, de densidad a 20 °C=1,522 ± 0,005 g/mL.
- Acido sulfúrico, de densidad a 20 °C=1,815 ± 0,002 g/mL.
- Alcohol isoamílico para el método Gerber, con densidad a 20 °C de 0,080 a 0,818 g/mL.
- Butirómetro para queso según Van Gulick graduado de 0 a 40%, completo.
- Butirómetro original Gerber, tipo IZ 511, graduado de 0 a 6%.
- Pipeta Gerber de 11 mL para leche.
- Centrífuga butirométrica Gerber de ORTO®.
- Dosificador automático BRAND, modelo Dispensette®, para medir 1,00 mL ± 0,05 mL de alcohol isoamílico.
- Dosificador automático BRAND, modelo Dispensette®, para medir 10,0 mL ± 0,2 mL de ácido sulfúrico.
- Balanza analítica con precisión de 1 mg, modelo AE 100 de Mettler®.
- Baño María con termostato regulable a 65 ± 2 °C, modelo Digiterm 3000542 de Selecta®.

Método:

Se midió por la Norma FIL 105 (1981), método de Gerber en leche y por la Norma ISO 33433 - 1975, método Van Gulick en cuajada y queso.

2.3.3.- Acidez de la leche

Reactivos y material:

- Bureta digital Brand® graduada cada 0,05 mL.
- Solución 0,1 N de hidróxido sódico.
- Solución alcohólica de fenoftaleína al 1%.

Método:

Se determinó según la Norma UNE 34100.

2.3.4.- Densidad de la leche

Reactivos y Material:

- Probeta de 250 mL con altura de 335 mm. y anchura de 42 mm.
- Lactodensímetro según Quewenne de Legal[®].

Método:

Se determinó según la Norma NF V04-204 (1969).

2.3.5.- Extracto seco

Reactivos y Material:

- Cápsulas de porcelana.
- Desecador con gel de sílice como deshidratante.
- Arena de mar lavada de grano fino.
- Balanza analítica Mettler[®], modelo AE 100.
- Estufa de desecación Indelab[®].

Método:

Se determinó en queso por la Norma FIL 4 (1958).

2.4.- Identificación de bacterias lácticas y enterococos

1 mL de cada una de las cepas aisladas y conservadas a 4 °C en caldo Elliker (Elliker y col., 1956), de Difco[®] o en caldo MRS (Man y col., 1960), de Difco[®] se resuspendió en 10 mL de dichos caldos y se incubó durante 24 horas a 32, 26 ó 37 °C según se tratase de estreptococos y lactobacilos, leuconostoc o enterococos respectivamente.

Posteriormente, se sembraron por estría en los medios selectivos adecuados (ver apartado 2.2.2.) con el fin de obtener colonias puras para poder realizar las pruebas de identificación.

La confirmación de las bacterias lácticas a nivel de género se hizo según los criterios de Sharpe (1979), detallados a continuación:

- Tinción de Gram y morfología de las colonias al microscopio a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial.

- Prueba de la catalasa:

Se coloca en un portaobjetos una colonia pura recogida con asa de siembra y se añaden 0,5 mL. de H₂O₂ de 10 volúmenes. Se observa la aparición de burbujas debida a la liberación de oxígeno, por la enzima catalasa.

- Tipo de fermentación láctica:

Las especies homofermentativas fermentan toda la glucosa a ácido láctico, mientras que las heterofermentativas producen además de ácido láctico, CO₂, etanol y en ocasiones ácido acético.

El medio utilizado para este test es el medio de Gibson y Abd-el Malek (1945). Se procede inoculando los tubos que contienen el medio de Gibson con el cultivo a testar, y se coloca un tapón de agar (4 mL). Se incuban a la temperatura más adecuada para cada género microbiano durante 7 días. La producción de gas (CO₂) se manifiesta por la formación de pequeñas grietas o burbujas en el medio e incluso por la elevación del tapón de agar.

El material y los aparatos utilizados, en general, para la identificación son los mismos que los indicados en el punto 2.2. de Análisis microbiológicos.

2.4.1.- Identificación de lactococos

Se consideraron lactococos los cocos Gram +, catalasa -, homofermentativos, incapaces de crecer a una temperatura de 45 °C y/o con concentraciones salinas del 6,5%, que crecieron en agar M 17 (Terzaghi y Sandine, 1975) de Bioser[®] y que presentaban al microscopio una disposición en parejas o cadenas (Colman y col., 1992).

La identificación se realizó según los criterios de Orvin (1986b), Hernández y Dubón (1992b) y Buchanan y Gibbons (1974).

Las pruebas bioquímicas utilizadas fueron las que se detallan a continuación (Sharpe 1962; Gireaud ,1985; McFaddin,1990):

- Prueba de la reducción de la leche con azul de metileno

Medio:

- Leche descremada de Difco® reconstituida al 10%.
- Solución de azul de metileno al 1%.

Método:

Se esterilizan por separado tubos con 9 mL de leche descremada reconstituida y una solución de azul de metileno al 1%. Se añade 1 mL de dicha solución a los tubos con leche y se inoculan éstos con la cepa problema, incubándolos a 32 °C de 24 a 48 horas.

Los organismos que poseen la enzima reductasa son capaces de reducir el azul de metileno y decoloran el medio formando en muchos casos un coágulo.

- Crecimiento a 40 y 45 °C

Medio:

- Medio Elliker (Elliker y col., 1956) de Difco®.

Método:

Se inoculan tubos conteniendo 10 mL de caldo Elliker con la cepa problema. Se incuban a 40 y 45 °C en baño María durante 48 horas. Se observa si existe crecimiento que se manifiesta por turbidez en el medio.

- Crecimiento con una concentración de cloruro sódico al 6,5%

Medio:

- Medio Elliker (Elliker y col., 1956), de Difco®.
- Cloruro sódico al 6,5%.

Método:

Se inoculan tubos conteniendo 10 mL de caldo Elliker con la cepa problema. Se incuban a 32 °C en baño María durante 48 horas. Se observa si existe crecimiento que se manifiesta por la turbidez del medio.

- Reducción del cloruro trifeniltetrazolio (TTC)

Medio:

- Agar de Barnes (Barnes, 1956).
- TTC al 1% de Difco®.
- Acetato de talio al 5% de Merck®.

Método:

A 100 mL de medio de Barnes estéril, se añade 1 mL de solución de TTC al 1% y 2 mL de solución de acetato de talio al 5% y se vierte en placas de Petri. Las cepas a testar se siembran en estría. La presencia de colonias rojas indica reducción del TTC a fenilformazán.

- Desaminación de la arginina

Medio:

- Caldo de arginina de Adsa Micro®.
- Reactivo de Nessler (Panreac®).

Método:

Se siembran, con la cepa a testar, tubos que contengan 5 mL de caldo de arginina estéril, se incuban durante 6 días a 32 °C y se añade a 1 mL de cultivo 0,5 mL de reactivo de Nessler. Una coloración roja indica la formación de amoníaco.

- Prueba del citrato

Medio:

- Agar citrato de Simmons (Simmons, 1926) de Difco®.

Método:

Se reparte el medio en tubos a razón de 5 mL por tubo y se esteriliza. Se deja solidificar en posición inclinada y se inocula en cola de pescado con la cepa problema. Se incuba a 32 °C durante 5 días.

Cada tipo de microorganismo da lugar a distintos productos del metabolismo del citrato, que producen una variación de la acidez del medio detectada por el indicador.

Se considera el resultado de la prueba positivo cuando el pico de flauta vira de verde a azul intenso (pH 7,6).

- Fermentación de azúcares

Medio:

- Caldo CTA (Cystine Trypcase Agar) de Biomerieux®.
- Indicador rojo de fenol.
- Azúcares: glucosa, maltosa, lactosa y rafinosa de Difco® o/y Sigma®.

Método:

El medio base (CTA) se distribuye en tubos (5 mL/tubo), se adicionan los distintos azúcares a una concentración final del 0,5%. Se inoculan los tubos y se incuban a 32 °C de 2 a 7 días. La fermentación de los azúcares se observa por un viraje del color del indicador de rojo a amarillo debido a la acidificación del medio.

- Api 20 Strep (BioMerieux®)

Algunas cepas dudosas se identificaron por este sistema, ya que no resultó efectivo en la mayoría de los casos.

2.4.2.- Identificación de lactobacilos

Se consideraron lactobacilos los bacilos Gram + y catalasa - que crecieron en Rogosa Agar (Rogosa y col., 1951).

La identificación se realizó según los criterios de Kandler y Weiss (1986) y Fernández y Dubón (1992d).

Las pruebas bioquímicas se exponen a continuación (Sharpe, 1962; Harrigan y McCance, 1979 y Gireaud, 1985):

- Crecimiento a 15 y 45 °C

Medio:

- MRS Broth (Man y col., 1960) de Difco®.

Método:

En tubos con 10 mL de caldo MRS se inoculan colonias puras de lactobacilos. Se incuban a 15 °C y 45 °C durante 14 días en estufa refrigerada y 48 horas en baño respectivamente. Se observa si existe crecimiento por la turbidez que se produce en el medio.

- Fermentación de azúcares

Medio:

- Caldo CTA (Cystine Trypcase Agar) de Biomerieux®.
- Indicador rojo de fenol.
- Azúcares: sacarosa, arabinosa, rafinosa, melibiosa, lactosa, salicina y celobiosa de Difco® o/y Sigma®.

Método:

El medio base (CTA) se distribuye en tubos (5 mL/tubo), se adicionan los distintos azúcares a una concentración final del 0,5%. Se inoculan los tubos y se incuban a 32 °C de 5 a 15 días. La fermentación de los azúcares se observa por un viraje del color del indicador de rojo a amarillo debido a la acidificación del medio.

- Tipo de fermentación

El medio y método es el indicado en las pruebas generales para la adscripción de las bacterias a su género (ver apartado 2.4.).

- Api 50 CHL (BioMerieux®)

Se identificaron algunas cepas dudosas por este sistema.

2.4.3.- Identificación de leuconostoc

Se consideraron leuconostoc los cocos Gram +, catalasa -, heterofermentativos que crecieron en MSE Agar (Mayeux y col., 1962) y que presentaban al microscopio una disposición en pares y raramente en cadenas.

La identificación se hizo según los criterios de Garvie (1986), y Fernández y Dubón (1992c).

Los medios y métodos utilizados para la identificación son los descritos por Garvie (1960) y Gireaud (1985) y se detallan a continuación:

- Prueba de la termorresistencia

Medio:

- Elliker Broth (Elliker y col., 1956) de Difco®.

Método:

Se inocula la cepa problema pura en tubos conteniendo 10 mL de caldo Elliker. Se colocan en un baño a 55 °C durante 15 minutos. Se incuban a 37 °C durante 48 horas.

La existencia de crecimiento se manifiesta por turbidez en el medio.

- Producción de dextranos

Medio:

- MSE Agar (Mayeux y col., 1962) de Bioser®.

Método:

A partir de un cultivo puro se siembran las placas de MSE Agar, en estría. Se incuban de 48 a 72 horas a 26 °C y se observa la aparición de colonias mucosas debido a la síntesis de dextranos.

- Producción de diacetilo

Medio:

- Leche descremada de Difco®.
- α -naftol.
- Alcohol etílico.
- Hidróxido potásico.

Método:

A partir de un cultivo puro se inoculan tubos conteniendo 10 mL de leche descremada estéril y se incuban durante 5 días a 26 °C. Se retira asépticamente una alícuota de 2,5 mL para la reacción Voges-Proskauer y se agregan directamente los reactivos: 0,6 mL de una disolución α -naftol al 5% y 0,2 mL de una solución de KOH al 40%. A continuación se agita el tubo suavemente y, se deja reposar durante 15 minutos. La reacción se considera positiva si aparece un color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoina).

- Fermentación de azúcares

Medio:

- Caldo CTA (Cystine Trypcase Agar) de Biomerieux®.
- Indicador rojo de fenol.
- Azúcares: sacarosa, arabinosa, fructosa, melibiosa y trealosa de Difco® o/y Sigma®.

Método:

El medio base (CTA) se distribuye en tubos (5 mL/tubo), se adicionan los distintos azúcares a una concentración final del 0,5%. Se inoculan los tubos y se incuban a 26 °C de 5 a 15 días. La fermentación de los azúcares se observa por un viraje del color del indicador de rojo a amarillo debido a la acidificación del medio.

2.4.4.- Identificación de enterococos

Se consideraron enterococos los cocos Gram +, catalasa -, homofermentativos aislados de M 17 Agar (Terzaghi y Sandine, 1975) o de KF *Streptococcus* Agar (Kenner y col., 1961) capaces de crecer a 45°C y con una concentración de cloruro sódico del 6,5%.

La identificación se llevó a cabo según los criterios de Orvin (1986a) y Hernández y Dubón (1992a).

Las pruebas bioquímicas fueron las descritas por Gross y col (1975) y Gireaud (1985) y se detallan a continuación:

- Crecimiento a 45 °C

Medio:

- Medio Elliker (Elliker y col., 1956) de Difco®.

Método:

Se inoculan tubos conteniendo 10 mL de caldo Elliker con la cepa problema. Se incuban a 45 °C en baño María durante 48 horas. Se observa si existe crecimiento que se manifiesta por turbidez en el medio.

- Crecimiento con una concentración de cloruro sódico al 6,5%

Medio:

- Medio Elliker (Elliker y col., 1956), de Difco®.
- Cloruro sódico al 6,5%.

Método:

Se inoculan tubos conteniendo 10 mL de caldo Elliker con la cepa problema. Se incuban a 37 °C en baño María durante 48 horas. Se observa si existe crecimiento que se manifiesta por la turbidez del medio.

- Prueba de la reducción de la leche con azul de metileno

Medio:

- Leche descremada de Difco® reconstituida al 10%.
- Solución de azul de metileno al 1%.

Método:

Se esterilizan por separado tubos con 9 mL de leche descremada reconstituida y una solución de azul de metileno al 1%. Se añade 1 mL de dicha solución a los tubos con leche y se inoculan éstos con la cepa problema incubándolos a 37 °C de 24 a 48 horas.

Los organismos que poseen la enzima reductasa son capaces de reducir el azul de metileno y decoloran el medio formando en muchos casos un coágulo.

- Tolerancia al telurito

Medio:

- Triptosa Agar Sangre de Oxoid®.
- Telurito potásico al 0,04%.

Método:

Se realiza una siembra en estría, con la cepa a testar, en placas previamente preparadas de triptosa agar sangre suplementadas con telurito potásico al 0,04%. Se incuban a 37 °C de 2 a 5 días. El crecimiento se manifiesta por colonias negras o grises.

- Fermentación del piruvato (Gross y col., 1975)

Medio:

- Triptona de Difco®.
- Extracto de levadura de Difco®.
- Azul de bromotimol al 0,4%.
- Sal sódica del ácido pirúvico de Sigma® al 1%.
- Cloruro sódico al 0,5%.
- Fosfato dipotásico al 0,5%.

Método:

Se prepara el medio y se reparte en tubos antes de esterilizar (5 mL/tubo). Se inoculan los tubos con la cepa a testar y se incuban de 18 a 24 horas a 37 °C. Si la bacteria es capaz de utilizar el piruvato como fuente de energía el medio vira de color azul a amarillo debido a una variación del pH.

- Fermentación de azúcares

Medio:

- Peptona 1%.
- Púrpura de bromocresol 0,004%.
- Cloruro sódico 0,5%.
- Azúcares al 0,5%: melicitosa, manitol, melibiosa, arabinosa e inulina de Difco[®] y/o Sigma[®].

Método:

Se dispensa el medio una vez preparado en tubos (5 mL/tubo) y se autoclava. Se incuban después de inocular a 37 °C durante 14 días. La prueba es positiva cuando el indicador vira de azul a amarillo debido a la fermentación del azúcar.

2.5.- Actividades enzimáticas de los enterococos

Se midió la actividad proteásica y aminopeptidásica de 13 cepas de enterococos aisladas de quesos de 4 meses.

Estas cepas fueron seleccionadas de un total de 40 a las que se midió la actividad acidificante y se realizó el test Api ZYM, y que mostraron actividades acidificantes y enzimáticas más altas.

Se rompieron las células con el fin de poder medir, por una parte, la actividad de los extractos libres de células y, por otra parte, la actividad de las células intactas.

El material y aparatos utilizados para la realización de estas pruebas fueron:

- Estufa BM 500 de Memmert[®].
- Centrífuga refrigerada Sigma, modelo 3K30.
- Cabezal angular de 8 tubos de 50 mL (28.600 x g).
- Autoclave Sterilclav - 75 de Raype[®].
- Espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV - 2101 PC.
- Campana de flujo laminar.
- Baño termostático - Digiterm 3000542 de Selecta[®].
- Baño de agitación, modelo G76 de New Brunswick[®].
- Cubetas para espectrofotómetro de cuarzo, de Perkin - Elmer[®].

2.5.1.- Medida de la actividad acidificante en leche descremada

Reactivos:

- Leche descremada de Difco® reconstituida al 10%.
- Solución alcohólica (etanol) de fenoftaleína al 1%.
- Hidróxido sódico 0,1N.

Método:

Se utilizó el método descrito por Martínez-Moreno (1976).

Se diluye 1 mL de un cultivo puro joven de una especie de enterococos conocida en 9 mL de leche descremada previamente esterilizada. Con 2 mL de este cultivo se inoculan 2 tubos conteniendo 9 mL de leche estéril, a razón de 1 mL/tubo, con el fin de obtener diluciones 1:100. Posteriormente se incuban los tubos a 30 °C durante 6 horas y transcurrido dicho tiempo se enfrían a 4 °C. Para determinar la acidez de cada cultivo, antes de ser valorados, se vierten sobre un vaso de precipitados. Se añaden a cada vaso dos gotas de una solución de fenoftaleína al 1% y se valoran con NaOH 0,1N hasta viraje a rosa pálido.

2.5.2.- Obtención de células intactas

Reactivos:

- Caldo Elliker (Elliker y col., 1956) de Difco®.
- Tampón 0,05 M Tris - HCl a pH 7.

Método:

Se siguió el método de Requena y col. (1991) descrito a continuación:

Se coge 1 mL de un cultivo de una especie de enterococos conocida conservada en frigorífico a 4 °C y se añade a 10 mL de caldo Elliker. Se incuban 24 horas a 37 °C antes de pasarlos a un frasco con 400 mL del mismo caldo y se repiten las condiciones de incubación. De esta manera obtenemos suficiente cantidad de masa celular en el comienzo de fase de crecimiento exponencial para poder realizar todas las pruebas.

Se centrifugan 200 mL de cultivo a 7.000 g durante 15 minutos, a 4 °C. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el “pellet” en tampón 0,05 M Tris HCl hasta obtener una densidad de 3 medida a 650 nm. La suspensión obtenida se congeló a - 20 °C.

2.5.3.- Obtención de extractos libres de células

Reactivos:

- Caldo Elliker (Elliker y col., 1956) de Difco®.
- Tampón 0,05 M Tris - HCl a pH 7.
- Cloruro Sódico al 0,9% (p/v).

Método:

El método utilizado fue el descrito por Tsakalidou y Kalantzopoulos (1992a) con algunas modificaciones:

200 mL de cultivo puro obtenido como se indica en el apartado 2.5.2. se centrifugan a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C. El "pellet" se lava dos veces con una solución de cloruro de sodio al 0,9% (p/v) y se resuspende en tampón 0,05 M Tris HCl a pH 7. Posteriormente se sonica durante 8 minutos (a intervalos de 10 segundos). El sobrenadante obtenido después de centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C es el extracto libre de células.

2.5.4.- Determinación de la concentración de proteínas en las células intactas y en los extractos libres de células

Reactivos:

- Lowry A:
 - Carbonato sódico.
 - Hidróxido sódico 0,1 N.
- Lowry B:
 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - Tartrato sódico.
- Reactivo de Folín.
- Albúmina bovina cristalizada.

Método:

Se describe a continuación la técnica utilizada (Lowry y col., 1951):

1 mL de células intactas o de extracto se diluye en un matraz aforado hasta 100 mL con cloruro sódico al 0,9% (p/v).

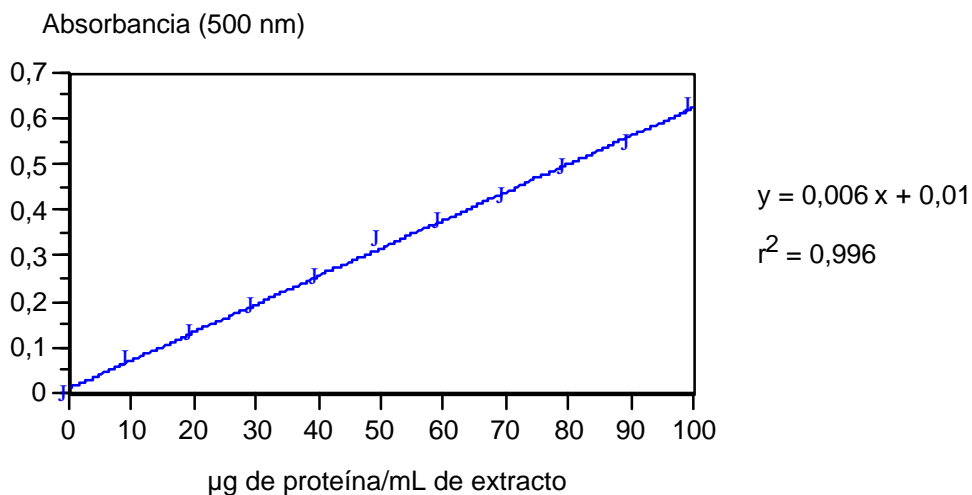


Figura 7.- Representación gráfica de la recta patrón obtenida con la albúmina bovina, para la determinación de proteína (técnica de Lowry) en los extractos celulares.

A 1 mL de cada disolución problema se le añaden 5 mL de Reactivo Lowry A y 1 mL de Reactivo Lowry B. Se deja reposar 10 minutos y se añaden 0,5 mL de Reactivo de Folín. Se agitan los tubos y se colocan 30 minutos a 30 °C en baño María. Transcurrido ese tiempo se mide la absorbancia de cada tubo a 500 nm.

Las unidades se expresan en µg de proteína por mL de células o extracto celular. La curva patrón, detallada en la figura 7, se realizó en función de distintas concentraciones de albúmina bovina cristalizada. La absorbancia para cada concentración fue la media de tres ensayos. En ningún caso los coeficientes de variación resultaron superiores al 7%.

2.5.5.- Medida de la actividad aminopeptidásica

Reactivos:

- Paranitroanilina de Sigma[®].
- L-Leucina p-nitroanilina de Sigma[®].
- L-Lisina p-nitroanilina de Sigma[®].
- Tampón 0,05 M fosfato de sodio a pH 7.
- Tampón 0,05 M fosfato de sodio a pH 5,5.

Método:

Se basó la técnica en el criterio de Requena y col. (1991) con algunas modificaciones que se exponen a continuación:

Con cada uno de los sustratos se prepara una solución 15,5 mM (con concentraciones más altas se obtienen los mismos resultados) en 0,05 mL de metanol. Se pipetea con micropipeta 200 µL de estas soluciones en dos tubos por cada cepa a testar. Se añaden 0,4 mL de células enteras o de extracto libre de células, y 3,6 mL de tampón 0,05 M fosfato de sodio a pH 7 y pH 5,5. Se incuban durante 4 horas en baño de agitación a 30 °C. Pasado este tiempo se añade a cada tubo 1 mL de ácido acético al 30% (v/v) para parar la reacción y se filtra el contenido de los tubos con papel Whatman[®] del N° 40. Se mide la nitroanilina desprendida a una longitud de onda de 410 nm.

Los resultados se expresan en nanomoles de sustrato degradados por minuto y por mg de proteína.

La curva patrón (figura 8) se realizó en función de la concentración de paranitroanilina por mL de ácido acético. La absorbancia para cada concentración fue la media de tres ensayos. En ningún caso los coeficientes de variación resultaron superiores al 4%, siendo inferiores al 1% en un 91% de las medidas.

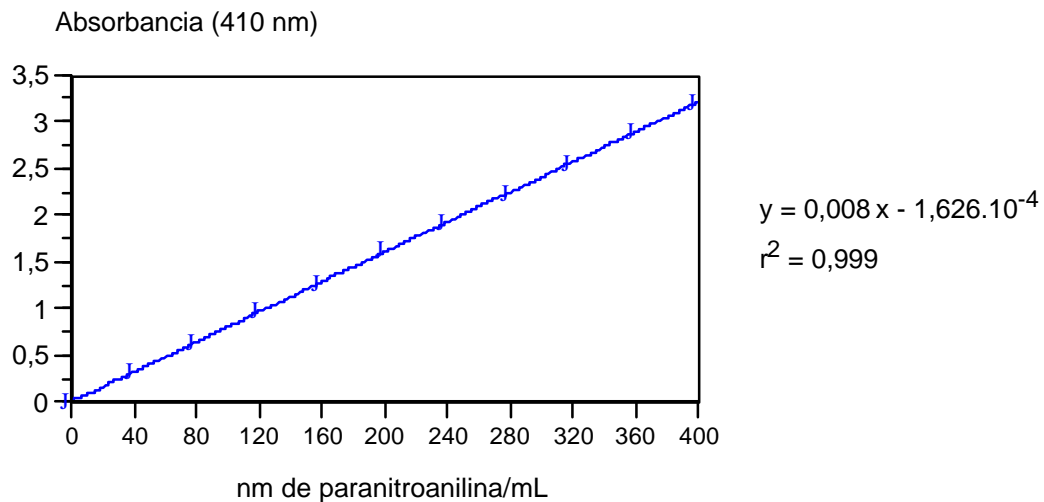


Figura 8.- Representación gráfica de la recta patrón obtenida con la paranitroanilina, para la determinación de la actividad aminopeptidasa en los extractos celulares.

2.5.6.- Medida de la actividad proteásica

Reactivos:

- Caseína de oveja purificada y liofilizada de Sigma®.
- o-Phthaldialdehyde (OPA) de Sigma®.
- Tetraborato de sodio de Sigma®.
- Dodecil sulfato de sodio de Sigma® (SDS).
- β-mercaptoetanol de Sigma®.
- L-Leucina de Sigma®.

Método:

El método utilizado (Church y col., 1983, 1985) se basa en la reacción del OPA y del β-mercaptoetanol con los grupos amino liberados durante la proteólisis de la proteína sustrato. La reacción es específica para las aminas primarias de aminoácidos, péptidos y proteínas formándose un complejo que absorbe fuertemente a 340 nm, y se puede determinar espectrofotométricamente.

La solución OPA se prepara combinando los siguientes reactivos diluidos a un volumen final de 50 mL con agua destilada:

- 25 mL de solución de tetraborato de sodio 10 mM.
- 5 mL de SDS al 10% (p/v).
- 40 mg de OPA disuelto en 1 mL de metanol.
- 0,1 mL de β -mercaptoetanol.

Se expone a continuación el procedimiento seguido :

Se disuelve en un tubo caseína de oveja en tampón fosfato de sodio a pH 8 (2 mg/mL) y se distribuye en dos tubos a razón de 2,7 mL/tubo. En cada tubo se añaden 0,3 mL de células enteras o de extracto libre de células y se incuban durante 4 horas a 37 °C en baño de agitación. Pasado este tiempo, a 200 μ L de la mezcla de la reacción se les adiciona 4 mL de reactivo OPA y se mide a los dos minutos la absorbancia a 340 nm.

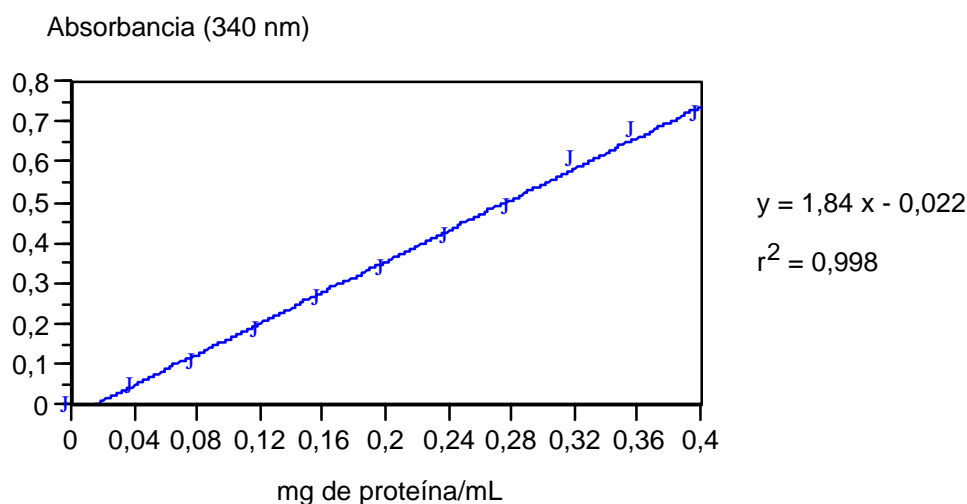


Figura 9.- Representación gráfica de la recta patrón obtenida con la caseína, para la determinación de la actividad caseinolítica en los extractos celulares.

Los resultados se expresan en mg de leucina liberados por minuto y por mg de proteína.

La curva patrón (figura 9) se construye con distintas concentraciones de leucina, ya que se ha visto que la absorbancia del complejo que se forma entre distintos aminoácidos y péptidos con el OPA no se ve influida por la naturaleza de éstos (Church y col., 1983). La absorbancia para cada concentración fue la media de tres ensayos. En ningún caso los coeficientes de variación resultaron superiores al 10%, siendo inferiores al 3% en un 85% de las medidas.

2.6.- Metodología estadística

El tratamiento de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS-X (SPSS, 1988) y el programa LSMLMW (Harvey, 1987). De los datos a analizar, únicamente los referidos a las variables fisicoquímicas (pH, extracto seco, materia grasa, materia grasa/extracto seco) se ajustaban a una distribución normal. Los parámetros microbiológicos (flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos) presentaron un carácter exponencial y por ello se sometieron a una transformación logarítmica previa al análisis de los resultados.

Los análisis estadísticos realizados fueron:

- Estadística descriptiva.

Medias aritméticas para las variables fisicoquímicas y geométricas para las microbiológicas y sus errores standard.

- Prueba del χ^2 .

En las identificaciones de las especies bacterianas, por tratarse de caracteres cualitativos. Se procedió a agrupar o suprimir algunas filas o columnas cuando el número de casillas con frecuencias teóricas inferiores a 5 superaba el 20% de casillas totales de la tabla, con el fin de que la prueba resultara suficientemente fiable.

- Prueba t de Student.

Para comprobar si existían diferencias significativas, entre las leches y entre los quesos de 4 meses en función de las Denominaciones de Origen estudiadas para cada una de las variables cuantitativas medidas.

- Análisis unidireccional de la varianza.

Para comprobar si existían diferencias significativas, entre las leches y entre los quesos de 4 meses en función de las queserías estudiadas para cada una de las variables cuantitativas medidas.

$$y_{ij} = \mu + Q_i + e_{ij}$$

donde:

y_{ij} = observaciones: pH, extracto seco, materia grasa, materia grasa/extracto seco, flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos.

μ = media aritmética para las variables fisicoquímicas y media geométrica para las variables microbiológicas.

Q_i = efecto fijo debido a la quesería ($i=1$, quesería 1; $i=2$, quesería 2; $i=3$, quesería 3; $i=4$ quesería 4; $i=5$, quesería 5; $i=6$ quesería 6).

e_{ij} = efecto residual aleatorio.

Los contrastes múltiples "a posteriori" entre queserías se realizaron mediante la prueba de Duncan.

- Análisis de componentes principales.

Es un método de análisis multivariable que se emplea para transformar un conjunto de variables intercorrelacionadas en otro conjunto de variables no correlacionadas, denominadas factores que contribuyan a explicar de forma resumida un alto porcentaje de la varianza total contenida en la matriz de datos original. El resultado supone una reducción considerable de variables y una pérdida pequeña de información. Previamente a la extracción de factores, se calculó la matriz de correlaciones entre todas las variables sobre la que se realizó el test de la esfericidad de Bartlett. Si esta prueba resultaba significativa, se podía afirmar que existían intercorrelaciones significativas entre las variables y la matriz de datos era adecuada para proceder al análisis factorial.

Para determinar el número de factores a conservar se aplicó el criterio de Kaiser (1960) y se conservaron solamente los componentes principales cuyos valores propios eran mayores que la unidad.

Con el fin de facilitar la interpretación de los factores y maximizar la varianza de los factores se realizó una rotación de factores aplicando el método de rotación Varimax.

Este análisis estadístico se empleó para encontrar qué variables cuantitativas de las estudiadas en leche y en quesos de 4 meses estaban correlacionadas.

- Cálculo de coeficientes de correlación.

Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson para medir la relación existente entre las leches y los quesos de 4 meses para cada una de las variables cuantitativas estudiadas.

- Análisis de varianza multifactorial.

Para el estudio de la evolución de las variables cuantitativas medidas en los quesos en función del tiempo de maduración, se aplicó el método de mínimos cuadrados y máxima verosimilitud de Harvey (1987).

Para seleccionar el modelo apropiado para cada variable se partió de un modelo general que contenía todos los factores que podían tener influencia. Posteriormente se llevo a cabo un análisis "step-down" (paso a paso) para eliminar sucesivamente los efectos no significativos hasta obtener el modelo óptimo (Harvey, 1987). Así mismo, cuando un efecto principal no resultaba significativo, pero sí lo era la interacción entre dicho efecto y otro, el referido efecto principal se mantenía en el modelo.

En consecuencia, para este estudio se incluyeron los efectos de la quesería y tiempo de maduración y el modelo utilizado es el que se especifica a continuación:

$$y_{ij} = \mu + Q_i + (b_1 + Qxb_{1i}) (X_{i(j)} - \bar{x}) + (b_2 + Qxb_{2i}) (X_{i(j)} - \bar{x})^2 + e_{ij}$$

donde:

y_{ij} = observaciones: pH, extracto seco, materia grasa, materia grasa/extracto seco, flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos.

μ = media aritmética para las variables fisicoquímicas y media geométrica para las variables microbiológicas.

Q_i = efecto fijo debido a la quesería ($i=1$, quesería 1; $i=2$, quesería 2; $i=3$, quesería 4; $i=4$ quesería 5).

$X_{i(j)}$ = tiempo de maduración del queso j de la quesería i.

\bar{x} = tiempo de maduración medio.

$b_1 + Qxb_{1i}$ = coeficiente de regresión lineal de la variable estudiada sobre el tiempo de maduración.

$b_2 + Qxb_{2i}$ = coeficiente de regresión cuadrático de la variable estudiada sobre el tiempo de maduración.

Qxb_{1i} = componente del coeficiente de regresión lineal debida a la interacción de la quesería i con el tiempo de maduración.

Q_{xb2i} = componente del coeficiente de regresión cuadrático debida a la interacción de la quesería i con el tiempo de maduración.
 e_{ij} = efecto residual aleatorio.

En el modelo se consideró también el efecto de la Denominación, pero en ningún caso su efecto fue significativo por lo que se eliminó este término. Así mismo, tampoco resultó significativo el coeficiente de regresión cúbico y se procedió como en el caso anterior.

- Regresión Simple y Múltiple.

A partir de los resultados obtenidos con el análisis indicado en el apartado anterior, se establecieron en los casos en los que el coeficiente de determinación se consideró aceptable (superior a 0,6), modelos de predicción para las variables estudiadas, aplicando un análisis de Regresión Simple o Múltiple por el método “stepwise”. El método “stepwise” permite seleccionar “paso a paso” las variables independientes que satisfagan el criterio de selección. Previamente a considerar los modelos como válidos, se comprobó que los residuales se distribúan al azar alrededor del valor medio de 0 y seguían una distribución normal.

BIBLIOGRAFIA

Barnes, E. M. (1956). Method for the isolation of faecal *streptococci* (Lancefield group D) from bacon factories. *J. Appl. Bacteriol.* 19, 193-203.

Berdague, J. L. y Grappin, R. (1987). Affinage et calité du Gruyère de Comté. II. Influence de L'affinage sur l'évolution des caractéristiques physico-chimiques des fromages. *Le Lait* 67 (2), 237.

Bergère, J. L., Guret, P. H., Hermier, J. y Mocquot, G. (1968). Les clostridiums de groupe butyrique dans les produits laitiers. *Annales du Institut Pasteur de Lille* 19, 41-59.

Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. (1974) en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, VIII ed. Williams and Wilkins. Baltimore. pp 490-511.

Colman, G., Efstration, A. y Morrison, D. (1992). *Streptococci* and related organisms en *Identifications methods in applied and environmental microbiology*. Ed. Board, R.G., Jones, D. y Skinner, F.A. pp 221-249.

Chapman, G.H. (1945). The significance of sodium chloride in studies of *Staphylococci*. *J. Bacteriol.* 50, 201-203.

Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. y Catignani, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66, 1219-1227.

Church, F.C., Porter, D.H., Catignani, G.L. y Swaisgood, H.E. (1985). An o-phthaldialdehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical Biochemistry* 146, 343-348.

Druce, R.G., Bebbington, N.N., Elson, K., Harcumbe, J. M. y Thomas, S.B. (1957). The determination of the *Coli-aerogenes* content of Milk and dairy equipment by plating in Violet Red Bile Agar incubated at 30 °C. *J. Appl. Bacteriol.* 20 (1), 1-10.

Elliker, P.R., Anderson, A.W. y Hannesson, G. (1956). An agar culture medium for lactic acid *Streptococci* and *Lactobacilli*. *J. Dairy sci.* 39,1611-1612.

Garvie, E.I. (1960). The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.* 27,283-292.

Garvie, E.I. (1986). Genus *Leuconostoc* en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2. Ed. Sneath, P., Mair, N., Sharpe, E. y Holt, J. pp 1071-1075. Williams y Wilkins. Londres.

Gibson, T. y Abd-el Malek, Y. (1945). The formation of CO₂ by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformes* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.* 14, 35-44.

Gross, K.C., Houghton, M.P. y Senterfit, L.B. (1975). Presuntive specialitation of *Streptococcus bovis* and other group D *Streptococci* from human sources by using arginine and pyruvate tests. *J. Clinical Microbiol.* 54-60.

Harrigan, W.F. y Mc Cance, M.E. (1979). Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. Ed. Academia. España.

Hernández Haba, J. y Dubón, F. (1992 a). En *Sistemática bacteriana* 12, 26-39.

Hernández Haba, J. y Dubón, F. (1992 b). En *Sistemática bacteriana* 12, 29-30.

Hernández Haba, J. y Dubón, F. (1992 c). En *Sistemática bacteriana* 12, 31-32.

Hernández Haba, J. y Dubón, F. (1992 d). En *Sistemática bacteriana* 14, 2-6.

Kandler, O. y Weiss, N. (1986). Regular non sporing Gram-positive rods en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2. Ed. Sneath, P., Mair, N., Sharpe, E. y Holt, J. pp 1208-1260. Williams y Wilkins. Londres.

Kenner, B.A., Clark, H. F. y Kabler, P.W. (1961). Faecal *Streptococci*. I. Cultivation and enumeration of *streptococci* in surface waters. *Appl. Microbiol.* 9, 15-18.

Laloux, J. (1986). La détermination des spores butyriques dans le lait cru destiné à la fromagerie. *Revue de l'Agriculture* 2, (39), 387-397.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biological Chemistry* 193, 265 - 275.

Mac Faddin, J.F. (1990). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana. México.

Man, J.C. , Rogosa, M. y Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* 23, 130-135.

Martínez-Moreno, J.L. (1976). Flora microbiana del queso Manchego. III. *Estreptococos*. *An. INIA/ Ser. General/ N. 4*.

Mayeux, J.V., Sandin, W.E. y Elliker, P.R. (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starters cultures. *J. Dairy Sci.* 45, 655-656.

Mossel, D.A.A., Eelderink, I., Koopmans, M. y Van Rossem, F. (1978). *Lab. Practice* 27, N° 12, 1049-1050.

Mossel, D.A., Kleynen - Semmeling, A.M.C., Vincentie, H.M., Beerens, H. y Catsaras, M, (1970). *J. Appl. Bact.* 33, 454-457.

Norma Fil - IDF 4 (1958). (1986). Determinación del extracto seco en queso. En “Métodos oficiales de análisis. Tomo I”. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

Norma Fil 105 (1981). Determinación del contenido en grasa. Butirómetros Gerber. En “Métodos oficiales de análisis. Tomo I”. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

Norma ISO 33433 - 1975. Determinación del contenido en grasa. Método Van Gulick. En “Métodos oficiales de análisis. Tomo I”. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

Orvin, J.L. (1986 a). *Enterococci* en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2. Ed. Sneath, P., Mair, N., Sharpe, E. y Holt, J. pp 1063-1065. Williams y Wilkins. Londres.

Orvin, J.L. (1986 b). Lactic Acid *Streptococci* en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2. Ed. Sneath, P., Mair, N., Sharpe, E. y Holt, J. pp 1065-1066. Williams y Wilkins. Londres.

Reglamento de la Denominación de Origen “Idiazábal” y su Consejo Regulador. (1993). Orden del 30 de noviembre del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación..

Reglamento de la Denominación de Origen “Roncal” y su Consejo Regulador. (1989). Orden Foral del 3 de julio de 1989 del Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes del Gobierno de Navarra.

Requena, T., Pelaéz, C. y Desmazeaud, M.J. (1991). Characterization of *Lactococci* and *Lactobacilli* isolated from semihard goat's cheese. *J. Dairy Res.* 58, 137-145.

Rogosa, M., Mitchell, J. A. y Wisimann, R.F. (1951). A selective medium for the isolation of oral and faecal *Lactobacilli*. *J. Bacteriol.* 62, 132-133.

Sharpe, M.E. (1962). Taxonomy of the *Lactobacilli*. *Dairy Science Abstracts* 24, 109-118.

Sharpe, M.E. (1979) en The Society for Applied Bacteriology technical series, N° 14. Skinner, F.A. y Loklock, P.W. Ed. Academic Press Inc., London.

Simmons, J. S. (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes group and for isolation of certain fungi. *J. Infected Dis.* 39, 209-211.

Terzaghi, B. E. y Sandine, W. E. (1975). Improved medium for Lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 29, 807-813.

Tsakalidou, E. y Kalantzopoulos, G. (1992). Purification and partial characterization of an esterase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strain ACA -DC 127. *Le Lait* 72, 533-543.

U. S. Dept. Health and Human Serv. (1980). Grade A pasteurized milk ordinance. No 017-001-00419-7. Washington, Dc:US. Gov. printing office.

3.- RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.- Análisis fisicoquímico y microbiológico de la leche

3.1.1.- Comparación entre Denominaciones

En la tabla 17 se indican los valores medios obtenidos para las variables fisicoquímicas y microbiológicas en la D.O. Roncal y en la D.O. Idiazábal, así como la significación estadística del efecto denominación.

Se han encontrado diferencias significativas entre ambas Denominaciones para todas las variables estudiadas, excepto para la grasa y el nivel de leuconostoc.

Los valores de pH de la leche recogida en las queserías acogidas a la D.O. Roncal y D.O. Idiazábal han sido de 6,51 y 6,62 respectivamente. Estas medidas de pH se consideran dentro de los límites normales para la leche de oveja (Assenat, 1991).

Los datos obtenidos para la leche de la D.O. Roncal son superiores a los descritos por Ordóñez y col. (1980). Estos autores obtuvieron valores medios de 6,30. Por otra parte, en un trabajo llevado a cabo sobre la evolución del pH durante la elaboración del queso Roncal, se han registrado valores de pH en la leche de partida del orden de 6,8 (Garciriain, 1995).

Ibáñez y col. (1993) y Pérez-Elortondo (1993a) encontraron para la leche de la D.O. Idiazábal datos de pH de 6,43 y 6,54 respectivamente. A su vez Guindeo y col. (1990) midieron valores medios de 6,63, similares a los del presente trabajo.

Estas diferencias de pH entre los distintos estudios, se consideran normales y se deben a que el pH no es un valor constante, sino que se ve modificado en el curso del ciclo de la lactación así como por las condiciones climáticas, de alimentación, de transporte y de almacenamiento (Alais, 1985; Assenat, 1991). Para el presente trabajo, se recogieron muestras de todas las queserías en los mismos días con el fin de disminuir los factores de variabilidad que pueden interferir en las conclusiones.

Tabla 17.- Valores medios y sus errores estandar de las variables: pH, acidez, densidad, materia grasa (M. grasa), mesófilos, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos de la leche de la D.O. Roncal y de la D.O. Idiazábal. Comparación entre Denominaciones mediante el test t-Student.

	D.O. Roncal	D.O. Idiazábal	
pH	6,51 ± 0,07	6,62 ± 0,10	* *
Acidez (°D)	23,27 ± 6,45	20,21 ± 0,69	* * *
Densidad	1,036 ± 0,001	1,037 ± 0,001	*
M. Grasa (%)	7,3 ± 0,3	7,2 ± 0,4	NS
Mesófilos (1)	6,41 ± 0,25	5,31 ± 0,33	* * *
Enterobacterias (1)	5,02 ± 0,29	3,07 ± 0,36	* * *
Coliformes (1)	4,76 ± 0,35	3,07 ± 0,35	* * *
Lactococos (1)	5,98 ± 0,30	4,45 ± 0,13	* * *
Lactobacilos (1)	4,68 ± 0,29	3,43 ± 0,14	* * *
Leuconostoc (1)	4,50 ± 0,37	4,10 ± 0,35	NS
Enterococos (1)	4,34 ± 0,29	3,15 ± 0,16	* * *

*=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001; NS=p>0,05

(1) Valores expresados en log ufc/mL.

Con respecto a la acidez, cabe señalar que se han detectado diferencias significativas entre ambas Denominaciones, siendo la acidez de la leche de la D.O. Roncal (23,27 °D) superior en tres grados a la de la D.O. Idiazábal (20,21 °D). La acidez de la D.O. Roncal se sitúa por encima del rango habitual para la leche de oveja (18-22 °D) y se atribuye a la alta carga bacteriana que presenta. Por otra parte, es necesario resaltar que el coeficiente de variación para este parámetro en la D.O. Roncal es del 23,6% y el error estandar de 6,45, lo que indica heterogeneidad entre las queserías adscritas a dicha Denominación.

El contenido en materia grasa es similar en la leche de ambas Denominaciones y se encuentra dentro de los valores normales (Assenat, 1991). Hay que tener en cuenta que, al igual que el pH, el porcentaje de materia grasa varía mucho a lo largo del periodo de lactación, aumentando al final de éste. Por lo tanto, las oscilaciones de la cantidad de materia grasa son importantes dependiendo del momento de recogida de las muestras de leche.

Como se ha mencionado anteriormente, el nivel de todos los microorganismos estudiados es muy superior en la D.O. Roncal, llegando incluso a encontrarse diferencias de casi dos unidades logarítmicas en el caso de las enterobacterias y coliformes. Se sugieren dos posibles causas de esta mayor carga microbiana:

- Las queserías de la D.O. Idiazábal estudiadas se proveen de leche de sus propios rebaños, lo que permite un ordeño más controlado y en mejores condiciones higiénicas. Las queserías acogidas a la D.O. Roncal manejan un volumen de leche mayor que adquieren de explotaciones no propias. Esto dificulta el control higiénico del ordeño y favorece la multiplicación de microorganismos.
- La distancia entre el lugar de ordeño y el de elaboración de los quesos es mayor en las queserías adscritas a la D.O. Roncal. Esto conlleva la necesidad de transporte y un mayor intervalo de tiempo entre la recogida y el comienzo de fabricación. Si durante este tiempo la leche no se encuentra en condiciones adecuadas de refrigeración, las bacterias proliferan ya que la leche es un medio rico en nutrientes. Por el contrario, en las queserías de la D.O. Idiazábal la leche se ordeña en lugares muy próximos a las queserías y el comienzo de elaboración es inmediato.

Hay que destacar que existen diferencias importantes entre las queserías acogidas a una misma denominación, como se verá en el apartado 3.1.2.

Los recuentos de bacterias lácticas encontrados en este trabajo para la leche de la D.O. Idiazábal son bastante similares a los descritos por Pérez-Elortondo y col. (1993a) para leche procedente de ovejas de la misma raza. Sin embargo, el número de flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes y enterococos es aproximadamente una unidad logarítmica superior. Los valores descritos en la bibliografía de recuentos microbiológicos en leche de oveja de raza Merina (Fernández del Pozo y col., 1988a) o Entrefina de Cáceres (Poulet y col., 1991) son generalmente superiores a los obtenidos en el presente estudio para la D.O. Idiazábal e inferiores a los detectados para la D.O. Roncal.

3.1.2.- Comparación entre queserías

En la tabla 18 se muestran los valores medios obtenidos para los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en las leches de las seis queserías estudiadas. Así mismo se señala la significación estadística del efecto quesería.

Las diferencias entre queserías son significativas para todas las variables estudiadas, excepto para la densidad. Estas diferencias no son solamente debidas a la Denominación, ya que se ha encontrado mucha

heterogeneidad entre las queserías adscritas a la D.O. Roncal, mientras que las acogidas a la D.O. Idiazábal presentan mayor uniformidad.

Con relación al pH y la acidez, se ha constatado que las queserías 1, 2, 3, 4 y 5 presentan valores similares para ambos parámetros y que las diferencias entre las dos Denominaciones, descritas en el apartado 3.1.1., se deben únicamente a la quesería seis. Esta, muestra valores de pH inferiores en más de 0,4 unidades a las otras cinco queserías y, una acidez aproximadamente 10 °D superior. La causa principal de esta acidez tan acusada se encuentra en la alta carga bacteriana que posee. Una acidez de la leche elevada, aumenta el riesgo de contaminación por bacterias patógenas y puede dar lugar a falta de uniformidad en el producto final, así como a defectos en la textura y en las características organolépticas de los quesos (Chávarri y col., 1988; Gómez y Peláez, 1989).

El contenido de materia grasa presenta oscilaciones considerables entre las queserías. Las queserías 4 y 1 son las que tienen un porcentaje más alto (8,0 y 7,9 respectivamente), seguidas de la 3 (7,6%). La quesería 2 con sólo un 6,2% es la que registra una cantidad menor. Estas diferencias resultan sorprendentes si se considera que las muestras de leche se han recogido los mismos días de todas y cada una de las queserías y, que éstas adquieren la leche de explotaciones localizadas en zonas geográficas parecidas. Por lo tanto, se han eliminado los factores que más intervienen en la fluctuación del contenido de materia grasa: evolución a lo largo del período de lactación, condiciones de cría de rebaños, alimentación, factores genéticos y condiciones climáticas. Es posible que las diferencias provengan de las variaciones individuales que existen entre animales de un mismo rebaño, como ha señalado Assenat (1991).

Tabla 18.- Valores medios y sus errores estandar de las variables: pH, acidez, densidad, materia grasa (M. Grasa), flora aerobia mesófila (Mes), enterobacterias (Entb), coliformes (Coli), lactococos (Lactc), lactobacilos (Lactb), leuconostoc (Leu) y enterococos (Entc) de la leche de seis queserías: tres acogidas a la D.O. Idiazábal (Q1, Q2 y Q3) y tres a la D.O. Roncal (Q4, Q5 y Q6). Comparación entre queserías mediante anova de una vía (asteriscos) y contrastes (letras) utilizando el test de Duncan.

	Queserías						
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	
pH	6,58±0,04 ^b	6,64±0,02 ^b	6,66±0,06 ^b	6,66±0,03 ^b	6,60±0,04 ^b	6,18±0,14 ^a	***
Acidez (°D)	21,22±0,90 ^a	19,24±1,26 ^a	20,15±0,64 ^a	20,34±0,49 ^a	20,75±0,85 ^a	30,55±3,20 ^b	***

Densidad	1,037±0,000	1,037±0,001	1,036±0,001	1,036±0,000	1,036±0,001	1,035±0,001	NS
M. Grasa (%)	7,9±0,2 ^{cd}	6,2±0,7 ^a	7,6±0,3 ^{cd}	8,0±0,2 ^d	6,5±0,3 ^{ab}	7,2±0,4 ^{bc}	***
Mes (1)	5,13±0,40 ^a	5,60±0,17 ^b	4,99±0,32 ^a	5,67±0,33 ^b	6,37±0,24 ^c	7,58±0,12 ^d	***
Entb (1)	2,26±0,69 ^a	3,95±0,25 ^b	2,73±0,60 ^a	4,07±0,22 ^b	4,98±0,33 ^c	6,50±0,20 ^d	***
Coli (1)	2,07±0,71 ^a	3,69±0,27 ^b	2,63±0,54 ^a	3,56±0,37 ^b	4,81±0,35 ^c	6,47±0,19 ^d	***
Lactc (1)	4,24±0,16 ^a	4,61±0,15 ^a	4,47±0,37 ^a	5,22±0,41 ^b	5,72±0,23 ^c	7,50±0,18 ^d	***
Lactb (1)	3,50±0,26 ^a	3,18±0,24 ^a	3,57±0,26 ^a	4,19±0,53 ^b	4,46±0,28 ^b	5,73±0,24 ^c	***
Leu (1)	3,89±0,48 ^{ab}	4,30±0,62 ^b	4,54±0,64 ^b	3,42±0,32 ^a	4,45±0,56 ^b	6,18±0,25 ^c	***
Entc (1)	2,96±0,29 ^a	3,52±0,29 ^b	2,91±0,07 ^a	3,52±0,39 ^b	4,23±0,28 ^c	5,56±0,33 ^d	***

*=p≤0,05; **= p≤0,01; ***=p≤0,001; NS=p>0,05.

Letras iguales en cada fila =p>0,05; letras distintas en cada fila =p≤0,05.

(1) Valores expresados en log ufc/mL.

En cuanto a los análisis microbiológicos cabe indicar que las queserías 1 y 3, acogidas a la D.O. Idiazábal, poseen niveles similares y los más bajos de carga microbiana. Aplicando la última Directiva Europea de 1994 (Directiva 94/71), únicamente las leches de las queserías 1, 2, 3 y 4 se ajustan a la norma que debe cumplir la leche cruda de oveja destinada a la elaboración de productos elaborados a base de leche cruda sin tratamiento térmico (≤1.000.000 ufc/mL). La leche de la quesería 5 es distinta a todas las demás y presenta un mayor recuento que las anteriores de todos los géneros microbianos (excepto lactobacilos y leuconostoc). En la quesería 6, se han detectado los niveles de contaminación microbiana más altos, asociados a una acidez muy elevada.

Las causas de estos recuentos son posiblemente, las ya señaladas en el apartado 3.1.1.: mayor volumen de leche procedente de explotaciones no propias, que dificultan el control higiénico del ordeño; transporte en condiciones de refrigeración inadecuadas; y un intervalo de tiempo prolongado entre la recogida de la leche y el comienzo de elaboración del queso, que permite la proliferación de bacterias. Los niveles elevados de microorganismos en la leche de las queserías 5 y 6 ponen de manifiesto la necesidad de establecer medidas de control, higiene y pago por calidad.

3.1.3.- Análisis de los componentes principales de la variación de los distintos parámetros estudiados en la leche

Con el propósito de determinar la interrelación existente entre los distintos factores de variabilidad que caracterizan la leche de oveja utilizada en la elaboración de quesos, se ha calculado la matriz de correlaciones entre todas las variables: pH, acidez, densidad, grasa, mesófilos, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos (tabla 19). Seguidamente, como puede apreciarse en las tablas 20 y 21, se ha realizado un análisis de componentes principales con el fin de resumir la información contenida en la matriz de datos original en un número pequeño de factores y encontrar qué variables de las analizadas presentan una evolución conjunta. El estudio se ha llevado a cabo agrupando las seis queserías en las que se han medido las variables.

Tabla 19.- Matriz de correlaciones entre las variables analizadas en la leche de oveja: pH, acidez, densidad, materia grasa (M. Grasa), mesófilos (Mes), enterobacterias (Entb), coliformes (Coli), lactococos (Lactc), lactobacilos (Lactb), leuconostoc (Leu) y enterococos (Entc).

	pH	Acidez	Densidad	Grasa	Mes	Entb	Coli	Lactc	Lactb	Leu	Entc
pH	1,000										
Acidez	-0,031	1,000									
Densidad	0,205	0,145	1,000								
M. Grasa	-0,265	0,278	-0,317	1,000							
Mes (1)	-0,321	0,253	-0,035	-0,058	1,000						
Entb (1)	-0,288	0,114	-0,005	-0,193	0,878 ***	1,000					
Coli (1)	-0,336	0,078	-0,030	-0,241	0,854 ***	0,974 ***	1,000				
Lactc (1)	-0,400	0,308	-0,131	-0,044	0,843 ***	0,774 ***	0,775 ***	1,000			
Lactb (1)	-0,444	0,187	-0,276	-0,102	0,615 ***	0,548 **	0,575 **	0,878 ***	1,000		
Leu (1)	0,140	0,427	0,311	-0,346	0,142	0,129	0,114	0,288	0,312	1,000	
Entc (1)	-0,461	0,236	0,219	-0,122	0,702 ***	0,710 ***	0,755 ***	0,739 ***	0,687 ***	0,316	1,000

= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.

Número de casos=30.

(1) El análisis se ha realizado con los datos iniciales transformados en logaritmos.

Tabla 20.- Resultados del análisis de componentes principales para la leche.

Factor	Valores propios	Varianza explicada	Varianza acumulada
		(%)	(%)
Factor 1	5,12470	46,6	46,6
Factor 2	1,88090	17,1	63,7
Factor 3	1,41561	12,9	76,6

Tabla 21.- Vectores propios del análisis de componentes principales para la leche.

Variables	Factor 1 (46,6%)	Factor 2 (17,1%)	Factor 3 (12,9%)
pH	-0,45826	0,53521	0,02263
Acidez	0,10766	-0,11489	0,87801
Densidad	-0,06258	0,69066	0,29276
Materia grasa	-0,18764	-0,83428	0,25373
Mesófilos (1)	0,90282	-0,03232	0,09029
Enterobacterias (1)	0,93015	0,09878	-0,06791
Coliformes (1)	0,94802	0,09825	-0,10470
Lactococos (1)	0,90404	-0,13340	0,24670
Lactobacilos (1)	0,75994	-0,30115	0,26476
Leuconostoc (1)	0,18916	0,47567	0,68662
Enterococos (1)	0,84154	0,08135	0,24618

(1) El análisis se ha realizado con los datos iniciales transformados en logaritmos.

Como se puede observar en las tablas 20 y 21, se han obtenido 3 componentes principales que explican el 76,6% de variabilidad total. Todos los microorganismos excepto los leuconostoc aparecen en el factor uno, lo que indica alta correlación entre ellos. Los leuconostoc se encuentran en el factor tres y están bastante asociados a la acidez. Este hecho corrobora la hipótesis de que los leuconostoc proliferan cuando aumenta la acidez del medio, como consecuencia del metabolismo de los lactococos (Vedamuthu, 1994).

Algunos autores (Gaya y col., 1986; Bengoechea, 1989) han señalado que las bacterias lácticas impiden el crecimiento de enterobacterias y coliformes, sin embargo, en este estudio aparecen correlacionadas positivamente con el resto de los géneros microbianos en el factor uno. Esto se debe posiblemente a que no ha

transcurrido un intervalo de tiempo suficiente como para que las bacterias lácticas produzcan un efecto en la disminución del número de enterobacterias y coliformes o, a que los niveles de éstas son demasiado elevados para poder apreciarse una inhibición.

Los parámetros fisicoquímicos no guardan mucha relación con los microbiológicos. La densidad y la materia grasa aparecen inversamente relacionadas, como era de esperar, en el factor dos. El pH forma parte tanto del factor uno como del dos aunque ninguno de los dos explica una varianza alta de esta variable. Sí parece posible, sin embargo establecer una cierta correlación entre pH y microorganismos, disminuyendo el pH al aumentar la carga microbiana.

La acidez es explicada por el factor tres y no está asociada a ningún otro parámetro fisicoquímico. Inicialmente se realizó el estudio de correlación entre la acidez y el pH con las 32 muestras de leche obteniéndose un coeficiente de correlación de -0,710. Se observó que dos de las muestras de leche, tenían valores de pH (5,97 y 6,07) y acidez (36,40 y 31,70 °D) anómalos. Por ello se volvió a calcular el coeficiente de correlación eliminando estas dos leches y el valor obtenido fue de -0,031. Se puede concluir, por lo tanto, que tanto pH como acidez sirven para diferenciar leches de baja calidad y que para valores normales de acidez (18-22 °D) y de pH (6,6-6,8) no existe correlación entre ambos parámetros.

3.2.- Análisis fisicoquímicos y microbiológicos de los quesos de 120 días de maduración

3.2.1.- Comparación entre Denominaciones

En la tabla 22 se indican los valores medios obtenidos para las variables fisicoquímicas y microbiológicas en la D.O. Roncal y en la D.O. Idiazábal, así como la significación estadística del efecto Denominación.

Se han encontrado diferencias significativas entre ambas Denominaciones para las variables: pH, flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos y enterococos.

El valor de pH medio para los quesos acogidos a la D.O. Roncal ha sido de 5,50. Este valor es aproximadamente 0,2 unidades inferior a los descritos por otros autores (Ordóñez y col., 1980; Millán y col., 1992), si bien el rango de pH no está definido en la Reglamentación de la D.O. Roncal. En los quesos con D.O. Idiazábal, se ha obtenido un pH medio de 5,35. Este valor se encuentra dentro del intervalo de pH (5,1-5,8) indicado en su respectiva Reglamentación.

Es de destacar, el hecho de que los valores de pH medidos en leche han sido algo más bajos en la D.O. Roncal que en la D.O. Idiazábal, mientras que el pH del queso ha sido superior en aquella. El incremento de pH, más acusado en los quesos acogidos a la D.O. Roncal, es posible que se deba a que éstos evolucionan más rápidamente. Por consiguiente, tendrían lugar antes en los quesos del Roncal los sucesos que se producen en fases avanzadas de la maduración y, que justifican un aumento de pH: metabolización del ácido láctico (Fox y col., 1990; González de Llano y col., 1992), de compuestos nitrogenados no proteicos y de ácidos orgánicos (Farkye y Fox, 1990).

En relación con los porcentajes de extracto seco y materia grasa/extracto seco, se ha constatado que las diferencias entre ambas Denominaciones no son significativas y las dos superan el mínimo exigido en sus respectivas Reglamentaciones (apartado 1.1.3. de la Introducción).

Tabla 22.- Valores medios y sus errores estandar de las variables: pH, materia grasa (M. grasa), extracto seco (ES), materia grasa/extracto seco (M. grasa/ES), mesófilos, enterobacterias,

coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos de los quesos de 4 meses de la D.O. Roncal y de la D.O. Idiazábal. Comparación entre denominaciones mediante el test t-Student.

	D.O. Roncal	D.O. Idiazábal	
pH	5,50 ± 0,04	5,35 ± 0,04	* * *
M. Grasa (%)	35,1 ± 0,7	35,1 ± 0,6	NS
ES (%)	66,80 ± 0,72	66,39 ± 0,70	NS
M. Grasa/ES (%)	52,5 ± 0,7	52,8 ± 0,6	NS
Mesófilos (1)	7,95 ± 0,10	7,65 ± 0,11	* * *
Enterobacterias (1)	0,48 ± 0,25	1,24 ± 0,34	* *
Coliformes (1)	0,49 ± 0,25	1,14 ± 0,35	* *
Lactococos (1)	7,99 ± 0,10	7,35 ± 0,23	* * *
Lactobacilos (1)	8,01 ± 0,13	7,53 ± 0,08	* * *
Leuconostoc (1)	6,50 ± 0,21	6,45 ± 0,19	NS
Enterococos (1)	5,20 ± 0,24	4,86 ± 0,16	*

* p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001; NS=p>0,05.

(1) Valores expresados en log ufc/g.

Con respecto a los análisis microbiológicos, hay que indicar que se han encontrado diferencias significativas entre la D.O. Roncal y la D.O. Idiazábal en los niveles de todos los géneros microbianos, excepto leuconostoc. Los recuentos de flora aerobia mesófila, bacterias lácticas y enterococos han resultado superiores en la D.O. Roncal y los de enterobacterias y coliformes en la D.O. Idiazábal. Sí se observa, sin embargo, que las diferencias entre ambas Denominaciones son menos pronunciadas en los quesos de 120 días que en la leche. Esta cierta amortiguación de las desigualdades se puede atribuir a que el proceso de elaboración y maduración de los quesos es parecido en ambas Denominaciones, lo que influye notablemente en la flora capaz de desarrollarse (Trépanier y col., 1991).

Cabe señalar que el recuento de enterobacterias y coliformes es bastante superior en los quesos de la D.O. Idiazábal. Si se tiene en cuenta que la contaminación por estas bacterias es muy superior en la leche de la D.O. Roncal, se puede concluir que el nivel de enterobacterias y coliformes presente en la leche, no parece guardar relación con el de los quesos de 120 días.

Los niveles de enterobacterias y coliformes encontrados en este estudio, para los quesos adscritos a la D.O. Idiazábal son superiores a los obtenidos por algunos autores para este tipo de queso (Pérez-Elortondo y col., 1993a,b) e inferiores a los descritos para otros tipos de quesos elaborados con leche cruda de oveja y madurados (Núñez y Martínez-Moreno, 1976; Fernández del Pozo y col., 1988a; González Crespo y col., 1990; Poulet y col., 1991). Es necesario considerar que existen diferencias entre las queserías acogidas a una misma Denominación, como se verá en el apartado 3.2.2.

Por otra parte, es de destacar que el grupo microbiano que presenta recuentos más elevados, superando incluso a los lactococos, es el género *Lactobacillus* (8,01 en la D.O. Roncal y 7,53 en la D.O. Idiazábal). Este hecho ha sido ya constatado en el queso Idiazábal (Pérez-Elortondo y col., 1993a) y en otras variedades de quesos de oveja (Núñez y Martínez-Moreno, 1976; Poulet y col., 1991; Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993) y corrobora la afirmación, de que los lactobacilos proliferan con facilidad y persisten en el queso hasta estadios avanzados de maduración (Ordóñez y col., 1980; Suárez y col., 1983).

El nivel de enterococos en los quesos de ambas Denominaciones es bastante elevado (5,20 en la D.O. Roncal y 4,86 en la D.O. Idiazábal) y es consecuencia de la capacidad que presentan los enterococos para desarrollarse en condiciones adversas, tolerando amplios rangos de temperatura y concentraciones salinas (Suárez y col., 1983; Hegazi 1990a). Los recuentos obtenidos en el presente estudio, coinciden con los descritos para el queso Idiazábal (Pérez-Elortondo y col., 1993a) y para otros tipos de queso similares (Iñigo y col., 1986; Thomson y Marth, 1986; Fernández del Pozo y col., 1988a; Poulet y col., 1991; Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993). Debido a su importancia cuantitativa, es posible que los enterococos contribuyan en la maduración de los quesos a través de sus actividades proteolíticas, lipolíticas y productoras de aromas, como han sugerido algunos autores (Trovatelli y col., 1987; Hagrass, 1991; Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993).

3.2.2.- Comparación entre queserías

En la tabla 23 se muestran los valores medios obtenidos para los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en las leches de las seis queserías estudiadas. Así mismo se señalan las significaciones estadísticas del efecto quesería.

Las diferencias entre queserías son significativas para todas las variables estudiadas, excepto para el nivel de leuconostoc.

Al estudiar el pH, se observa que las tres queserías adscritas a la D.O. Idiazábal no difieren entre sí. A su vez, dos de ellas (1 y 3) tampoco presentan diferencias significativas con la 4 y la 6, pertenecientes a la D.O. Roncal. La quesería 5 es distinta a las demás y muestra el pH más elevado (5,46). También se ha constatado cómo la quesería 6 a pesar de tener la leche con pH más bajo, registra en queso uno de los valores más elevados. Este hecho sugiere, que no parece existir correlación entre el pH de la leche y el de los quesos de 120 días .

Respecto al porcentaje de materia grasa y de materia grasa/extracto seco, es necesario destacar que todas las queserías superan los mínimos exigidos en sus respectivas Reglamentaciones (apartado 1.1.3. de la Introducción).

Los parámetros materia grasa, extracto seco y materia grasa/extracto seco que presentan diferencias no significativas al considerar el efecto Denominación (apartado 3.2.1.), muestran diferencias significativas al estudiar el efecto quesería. Esto indica heterogeneidad de estas variables entre las queserías acogidas a una misma Denominación. Las queserías 4 y 1 son las que presentan mayor contenido de materia grasa (53,8 y 53,6% respectivamente), seguidas de la 3 (53,2%). Las queserías 2 (51,9%) y 6 (51,4%) registran los menores porcentajes. Por lo tanto, se pone de manifiesto que las queserías que han elaborado los quesos con leche con mayor porcentaje en grasa (4, 1 y 3) son las que producen generalmente quesos más grasos.

Tabla 23.- Valores medios y sus errores estandar de las variables: pH, materia grasa (M. Grasa), extracto seco (ES), materia grasa/extracto seco (M. Grasa/ES), flora aerobia mesófila (Mes), enterobacterias (Entb), coliformes (Coli), lactococos (Lactc), lactobacilos (Lactb), leuconostoc (Leu) y enterococos (Entc) de los quesos de 4 meses de seis queserías: tres acogidas a la D.O. Idiazábal (Q1, Q2 y Q3) y tres a la D.O. Roncal (Q4, Q5 y Q6). Comparación entre queserías mediante anova de una vía (asteriscos) y contrastes (letras) utilizando el test de Duncan. En el caso de las enterobacterias y coliformes se ha empleado el test χ^2 .

	Queserías						
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	
pH	5,35± 0,06 ^{ab}	5,33±0,04 ^a	5,35±0,10 ^{ab}	5,44±0,05 ^b	5,59±0,06 ^c	5,46±0,09 ^b	* * *
M. Grasa (%)	35,6±0,8 ^{bc}	33,4±0,9 ^a	36,6±1,3 ^{cd}	37,0±0,8 ^d	34,8±0,8 ^b	32,8±1,1 ^a	* * *
ES (%)	66,41±0,73 ^b	64,35±1,03 ^a	68,86±1,35 ^c	68,67±0,45 ^c	66,97±1,23 ^b	63,75±0,74 ^a	* * *
M. Grasa/ES (%)	53,6±1,0 ^{bc}	51,9±0,8 ^{ab}	53,2±1,2 ^{abc}	53,8±0,9 ^c	52,0±0,9 ^{ab}	51,4±1,9 ^a	*
Mes (1)	7,90±0,18 ^{bc}	7,70±0,13 ^{ab}	7,43±0,15 ^a	7,88±0,21 ^{bc}	8,00±0,16 ^c	7,99±0,10 ^{bc}	* * *
Entb (1)	0,32±0,33	1,66±0,57	1,98±0,72	0,00±0,00	0,87±0,52	0,63±0,54	* * *
Coli (1)	0,32±0,32	1,63±0,56	1,71±0,86	0,00±0,00	0,84±0,51	0,69±0,59	* * *
Lactc (1)	7,72±0,22 ^{bc}	6,94±0,17 ^a	7,36±0,16 ^{ab}	7,98±0,17 ^c	7,92±0,21 ^c	8,12±0,09 ^c	* * *
Lactb (1)	7,64±0,17 ^{ab}	7,56±0,11 ^a	7,35±0,15 ^a	8,06±0,21 ^c	7,88±0,25 ^{bc}	8,13±0,14 ^c	* * *
Leu (1)	6,63±0,20	6,69±0,07	6,17±0,18	6,65±0,19	6,44±0,17	6,36±0,38	NS
Entc (1)	4,79±0,36 ^b	4,72±0,28 ^{ab}	5,16±0,11 ^b	4,32±0,24 ^a	5,71±0,32 ^c	5,77±0,05 ^c	* * *

*=p≤0,05; **= p≤0,01; ***=p≤0,001; NS=p>0,05.

Letras iguales en cada fila =p>0,05; letras distintas en cada fila =p≤0,05.

(1) Valores expresados en log ufc/g.

En cuanto a los análisis microbiológicos, cabe indicar que se han encontrado diferencias significativas entre las queserías en los niveles de todos los microorganismos, excepto leuconostoc. No obstante, se ha observado mucha menor heterogeneidad entre los quesos que entre las leches en las queserías 4, 5 y 6 de la D.O. Roncal.

Los niveles de enterobacterias y coliformes difieren bastante entre las queserías pertenecientes a la D.O. Idiazábal, presentando mayor uniformidad las acogidas a la D.O. Roncal. En la quesería 4 no se ha detectado la presencia de estas bacterias en los quesos de 120 días mientras que en las queserías 1, 5 y 6 el recuento ha sido inferior a 10 unidades formadoras de colonias por gramo de queso. Las queserías 2 y 3 muestran los niveles más elevados. Estableciendo una comparación con los recuentos obtenidos en leche, se pone de manifiesto que la disminución del número de estas bacterias a lo largo de la maduración es más acusada en los quesos del Roncal.

Los lactococos y lactobacilos presentan recuentos inferiores en las tres queserías de la D.O. Idiazábal. Las tres queserías acogidas a la D.O. Roncal muestran recuentos algo más elevados y similares, atenuándose las diferencias que había en la leche de partida.

Los mayores niveles de lactococos y lactobacilos y el descenso más pronunciado de enterobacterias y coliformes en los quesos de la D.O. Roncal se pueden atribuir a que los quesos acogidos a la citada Denominación evolucionan más rápidamente, como ya se ha mencionado en el apartado anterior.

3.2.3.- Análisis de los componentes principales de la variación de los distintos parámetros estudiados en los quesos de 120 días de maduración

Con el propósito de determinar la interrelación existente entre los distintos factores de variabilidad que caracterizan los quesos elaborados con leche cruda de oveja de 120 días de maduración, se ha calculado la matriz de correlaciones entre todas las variables: pH, materia grasa, extracto seco, materia grasa/extracto seco, flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos (tabla 24). Seguidamente, como figura en las tablas 24 y 25, se ha realizado un análisis de componentes principales con el fin de resumir la información contenida en la matriz de datos original en un número pequeño de factores y encontrar qué variables de las analizadas muestran una evolución conjunta. El estudio se ha llevado a cabo agrupando las seis queserías en las que se han medido las variables.

Tabla 24.- Matriz de correlaciones entre las variables analizadas en quesos de oveja de 120 días de maduración: pH, materia grasa (M. Grasa), extracto seco (ES), materia grasa/extracto seco (M. Grasa/ES), flora aerobia mesófila (Mes), enterobacterias (Entb), coliformes (Coli), lactococos (Lactc), lactobacilos (Lactb), leuconostoc (Leu) y enterococos (Entc).

	pH	grasa	ES	grasa/ES	Mes	Entb	Coli	Lactc	Lactb	Leu	Entc
pH	1,000										
M. Grasa	-0,275	1,000									
ES	-0,130	0,695 ***	1,000								
M.Grasa/ES	-0,265	0,782 ***	0,096	1,000							
Mes (1)	0,125	-0,140	-0,012	-0,184	1,000						
Entb (1)	-0,113	-0,015	-0,199	0,146	-0,144	1,000					
Coli (1)	-0,092	-0,054	-0,268	0,151	-0,118	0,982 ***	1,000				
Lactc (1)	0,043	0,057	0,003	0,075	0,725 ***	-0,123	-0,098	1,000			
Lactb (1)	0,178	0,051	0,040	0,040	0,679 ***	-0,186	-0,165	0,758 ***	1,000		
Leuco (1)	-0,050	0,303	0,122	0,315	0,338 **	-0,001	0,022	0,272	0,164	1,000	
Entc (1)	0,270	-0,174	-0,064	-0,178	-0,133	0,007	-0,006	-0,101	-0,062	-0,051	1,000

= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.

Número de casos=48.

(1) El análisis se ha realizado con los datos iniciales transformados en logaritmos.

Tabla 25.- Resultados del análisis de componentes principales para los quesos de 120 días de maduración.

Factor	Valores propios	Varianza explicada (%)	Varianza acumulada (%)
Factor 1	2,85164	23,8	23,8
Factor 2	2,48310	20,7	44,5
Factor 3	2,02449	16,9	61,3
Factor 4	1,27289	10,6	71,9

Tabla 26.- Vectores propios del análisis de componentes principales para los quesos de 120 días de maduración.

Variables	Factor 1 (23,8%)	Factor 2 (20,7%)	Factor 3 (16,9%)	Factor 4 (10,6%)
pH	0,23123	-0,30533	-0,08510	0,48993
M. grasa	-0,03527	0,96014	-0,08744	-0,15204
Extracto seco (ES)	-0,05097	0,62212	-0,40826	-0,04853
M. grasa/ES	-0,00342	0,79188	0,22804	-0,15928
Mesófilos (1)	0,88567	-0,12977	-0,07404	-0,08549
Enterobacterias (1)	-0,11119	0,03091	0,95538	-0,04621
Coliformes (1)	-0,07716	-0,00104	0,97296	-0,04372
Lactococos (1)	0,88922	0,06702	-0,03387	-0,08120
Lactobacilos (1)	0,86400	0,02589	-0,01241	-0,04016
Leuconostoc (1)	0,43221	0,49615	0,12024	0,10337
Enterococos (1)	-0,05942	-0,04996	0,04015	0,84335

(1) El análisis se ha realizado con los datos iniciales transformados en logaritmos.

En las tablas 25 y 26 figuran los cuatro primeros factores que retienen un 71,9% de la varianza. Las variables con más peso en el primer componente principal son la flora aerobia mesófila, los lactococos y los lactobacilos. La alta correlación entre lactococos y lactobacilos se atribuye a que ambos grupos constituyen los géneros bacterianos predominantes y siguen una evolución conjunta a lo largo de toda la maduración (Ramos y col., 1982; Pérez-Elortondo y col., 1993a). La presencia en el mismo componente principal de la flora aerobia mesófila se justifica porque los lactobacilos y lactococos constituyen la fracción cuantitativamente más importante de los mesófilos (Núñez, 1978; Pouillet, 1991).

En el factor dos aparecen correlacionadas positivamente las variables: materia grasa, extracto seco y materia grasa/extracto seco. Esta asociación se explica fácilmente, ya que el porcentaje de materia grasa va aumentando progresivamente durante la maduración debido a la pérdida de agua presente en el queso (Fernández del Pozo y col., 1989). Estos tres parámetros no guardan mucha relación con las variables microbiológicas. Por otra parte, se ha constatado que ninguno de los cuatro componentes principales señalados explica una varianza alta del pH.

Las variables con mayor presencia en el tercer componente principal, que explica el 16,9% de la variabilidad total, son las enterobacterias y coliformes. Ambos grupos presentan niveles muy bajos y una evolución similar desapareciendo a lo largo del periodo de maduración, como consecuencia del descenso inicial de pH y la utilización de cultivos lácticos (Gaya y col., 1983).

Los enterococos se encuentran en el factor cuatro y no están correlacionados con las variables microbiológicas, al contrario de lo que se ocurre en la leche. Esto indica que evolucionan de forma independiente, como algunos autores han señalado (García y col., 1987; Pouillet, 1991).

3.3.- Correlación entre los parámetros estudiados en la leche y en los quesos de 4 meses de maduración

En este apartado se incluyen los resultados obtenidos en el análisis de los coeficientes de correlación existentes entre las variables analizadas en la leche (pH, materia grasa, flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos) y las mismas variables en los quesos de 4 meses de maduración, cuando se consideran las seis queserías en las que se han medido las variables conjuntamente.

Tabla 27.- Coeficientes de correlación entre las variables analizadas en leche y en quesos de 120 días: pH, materia grasa (M. Grasa), flora aerobia mesófila (Mes), enterobacterias (Entb), coliformes (Coli), lactococos (Lactc), lactobacilos (Lactb), leuconostoc (Leu) y enterococos (Entc).

pH	M. Grasa	Mes (1)	Entb (1)	Coli (1)	Lactc (1)	Lactb (1)	Leu (1)	Entc (1)
0,165	0,559 **	0,278	0,275	0,341	0,123	-0,064	0,550 **	0,341

*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

Número de casos=48.

(1) El análisis se ha realizado con los datos iniciales transformados en logaritmos.

En la tabla 27 puede apreciarse que entre las variables pH, flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos y enterococos en leche y queso no existe correlación significativa y únicamente en los parámetros materia grasa y leuconostoc se encuentran correlaciones significativas ($p \leq 0,01$).

La ausencia de correlación entre los niveles de enterobacterias y coliformes en leche y queso difiere de los resultados constatados por algunos autores (González y col., 1990; Macedo y col., 1993). En estos trabajos se concluye que los recuentos de enterobacterias y coliformes en queso están en función de la contaminación inicial de la leche. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que en el presente estudio se han analizado los quesos de cuatro meses y sería lógico pensar en una posible mayor correlación en estadios previos de maduración como ya se constató en un trabajo anterior (Arizcun y col., 1993).

3.4.- Caracterización de la evolución de los quesos a lo largo del periodo de maduración

3.4.1.- Estadística descriptiva

En las tablas 28 y 29 se muestran las medias y errores estandard obtenidos para las variables que se indican en los quesos de cuatro queserías: dos acogidas a la D.O. Idiazábal (1 y 2) y dos a la D.O. Roncal (4 y 5) a lo largo del periodo de maduración.

Tabla 28.- pH, extracto seco (ES), materia grasa (M. Grasa), materia grasa/extracto seco (M. Grasa/ES), mesófilos (Mes) y enterobacterias (Entb) de los quesos elaborados por las queserías 1 y 2 (D.O. Idiazábal), 4 y 5 (D.O. Roncal) a los 1, 2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 150 días de maduración.

Quesería	Días	pH n=3	ES (%) n=3	M. Grasa (%) n=3	M.Grasa/ES (%) n=3	Mes (log ufc/g) n=3	Entb (log ufc/g) n=3
Quesería 1	1	5,35 ± 0,06	56,20 ± 1,97	31,75 ± 0,25	56,55 ± 1,43	8,79 ± 0,61	4,53 ± 0,90
	2	5,22 ± 0,09	55,74 ± 1,65	29,67 ± 1,17	53,21 ± 0,53	9,30 ± 0,14	3,74 ± 0,74
	10	5,23 ± 0,02	58,62 ± 0,49	32,25 ± 0,75	55,03 ± 1,74	9,15 ± 0,05	3,75 ± 0,68
	20	5,24 ± 0,04	58,65 ± 0,16	30,75 ± 0,75	52,42 ± 1,14	9,15 ± 0,12	3,45 ± 0,67
	30	5,16 ± 0,05	59,45 ± 1,33	31,24 ± 1,66	52,57 ± 1,73	8,32 ± 0,15	3,27 ± 0,08
	60	5,21 ± 0,01	61,10 ± 0,56	32,28 ± 0,54	52,84 ± 1,39	7,87 ± 0,12	2,34 ± 0,35
	90	5,31 ± 0,08	64,15 ± 1,52	35,55 ± 0,77	55,43 ± 0,75	7,74 ± 0,24	2,32 ± 0,38
	120	5,38 ± 0,08	65,97 ± 1,33	36,48 ± 0,51	55,31 ± 0,34	7,83 ± 0,36	0,80 ± 0,20
Quesería 2	150	5,41 ± 0,12	68,34 ± 2,01	37,50 ± 1,04	54,93 ± 1,52	7,06 ± 0,37	0,59 ± 0,37
	1	5,23 ± 0,07	52,72 ± 1,63	28,63 ± 1,38	54,21 ± 1,83	9,23 ± 0,14	4,71 ± 0,25
	2	5,17 ± 0,01	55,33 ± 0,12	30,40 ± 0,28	54,93 ± 0,44	9,67 ± 0,43	4,19 ± 0,45
	10	5,26 ± 0,04	58,73 ± 1,50	31,50 ± 0,15	53,67 ± 1,37	9,35 ± 0,25	3,79 ± 0,27
	20	5,24 ± 0,04	58,34 ± 0,18	30,75 ± 0,75	52,71 ± 1,45	8,82 ± 0,26	4,06 ± 0,04
	30	5,28 ± 0,09	58,65 ± 0,63	32,36 ± 0,18	55,18 ± 0,43	8,27 ± 0,34	3,56 ± 0,18
	60	5,23 ± 0,02	62,00 ± 1,53	32,06 ± 1,20	51,76 ± 1,08	7,71 ± 0,33	2,14 ± 0,60
	90	5,26 ± 0,04	63,88 ± 1,47	34,21 ± 1,20	53,57 ± 0,27	7,72 ± 0,22	1,80 ± 0,73
Quesería 4	120	5,29 ± 0,06	67,54 ± 0,71	35,45 ± 0,85	52,47 ± 0,75	7,60 ± 0,28	N.D.
	150	5,40 ± 0,07	69,99 ± 0,90	37,02 ± 0,68	52,90 ± 0,77	6,37 ± 0,73	N.D.
	1	5,33 ± 0,01	59,80 ± 0,20	33,00 ± 0,12	55,18 ± 0,32	6,86 ± 1,34	4,98 ± 0,46
	2	5,25 ± 0,03	59,22 ± 0,76	33,11 ± 0,07	55,92 ± 0,61	8,83 ± 0,05	4,99 ± 0,39
	10	5,12 ± 0,03	59,30 ± 0,07	33,00 ± 0,08	55,65 ± 0,06	8,71 ± 0,13	3,13 ± 0,38
	20	5,13 ± 0,02	60,69 ± 0,24	33,50 ± 0,06	55,20 ± 0,21	8,31 ± 0,19	2,74 ± 0,74
	30	5,26 ± 0,10	63,70 ± 0,49	35,27 ± 0,67	55,36 ± 0,69	8,47 ± 0,22	2,68 ± 0,25
	60	5,28 ± 0,08	66,83 ± 0,85	36,05 ± 0,40	53,95 ± 0,68	8,26 ± 0,72	0,86 ± 0,63
Quesería 5	90	5,34 ± 0,08	67,97 ± 0,86	36,71 ± 0,68	54,02 ± 1,19	6,97 ± 0,59	N.D.
	120	5,39 ± 0,08	69,60 ± 0,75	39,33 ± 0,34	56,51 ± 0,28	7,51 ± 0,25	N.D.
	150	5,42 ± 0,06	72,99 ± 1,72	39,75 ± 0,52	54,51 ± 1,29	8,03 ± 0,40	N.D.
	1	5,32 ± 0,01	60,17 ± 0,10	55,18 ± 0,32	54,85 ± 0,38	6,60 ± 2,08	6,05 ± 1,53
	2	5,36 ± 0,05	57,51 ± 1,66	55,92 ± 0,61	52,86 ± 1,30	8,69 ± 0,11	5,76 ± 0,98
	10	5,30 ± 0,01	57,67 ± 1,14	55,65 ± 0,06	52,46 ± 1,87	8,36 ± 0,06	5,29 ± 1,10
	20	5,28 ± 0,03	57,16 ± 1,18	55,20 ± 0,21	52,25 ± 1,17	8,76 ± 0,21	5,24 ± 1,12
	30	5,36 ± 0,08	59,24 ± 1,39	55,36 ± 0,69	52,11 ± 1,83	8,28 ± 0,11	3,01 ± 0,53
	60	5,50 ± 0,14	61,45 ± 1,17	53,95 ± 0,68	51,63 ± 1,00	8,01 ± 0,14	1,62 ± 0,64
	90	5,61 ± 0,11	64,08 ± 1,07	54,02 ± 1,19	51,24 ± 1,37	7,87 ± 0,10	1,16 ± 0,56
	120	5,64 ± 0,10	65,76 ± 1,61	56,51 ± 0,28	52,69 ± 1,23	7,90 ± 0,30	0,90 ± 0,40
	150	5,67 ± 0,15	69,33 ± 0,85	54,51 ± 1,29	53,87 ± 0,60	7,64 ± 0,06	N.D.

n=número de quesos en cada estadio de maduración. N.D.= no detectado.

Tabla 29.- Coliformes (Coli), lactococos (Lactc), lactobacilos (Lactb), leuconostoc (Leu) y enterococos (Entc) de los quesos elaborados por las queserías 1 y 2 (D.O. Idiazábal), 4 y 5 (D.O. Roncal) a los 1, 2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 150 días de maduración.

Quesería	Días	Coli (log ufc/g) n=3	Lactc (log ufc/g) n=3	Lactb (log ufc/g) n=3	Leu (log ufc/g) n=3	Entc (log ufc/g) n=3
Quesería 1	1	4,22 ± 0,94	9,29 ± 0,07	8,73 ± 0,21	5,40 ± 1,11	7,32 ± 0,41
	2	4,06 ± 0,71	9,09 ± 0,07	9,07 ± 0,21	4,86 ± 0,85	6,49 ± 1,09
	10	3,89 ± 0,47	9,03 ± 0,10	7,92 ± 0,53	6,46 ± 1,03	7,99 ± 1,11
	20	3,40 ± 0,76	9,16 ± 0,03	8,31 ± 0,47	6,32 ± 1,35	6,64 ± 0,04
	30	3,13 ± 0,27	8,63 ± 0,26	7,51 ± 0,38	6,12 ± 1,05	5,86 ± 0,70
	60	2,17 ± 0,47	8,05 ± 0,13	7,85 ± 0,03	6,01 ± 0,76	5,10 ± 0,65
	90	2,14 ± 0,33	7,82 ± 0,19	7,78 ± 0,19	6,45 ± 0,99	5,71 ± 0,74
	120	0,80 ± 0,30	7,94 ± 0,30	7,99 ± 0,26	6,39 ± 0,95	5,02 ± 0,52
Quesería 2	150	0,56 ± 0,35	7,05 ± 0,37	6,93 ± 0,41	6,06 ± 0,84	4,25 ± 0,67
	1	4,31 ± 0,37	9,21 ± 0,11	8,94 ± 0,41	5,20 ± 0,50	8,21 ± 0,91
	2	4,46 ± 0,24	9,69 ± 0,44	9,60 ± 0,47	5,12 ± 0,40	7,08 ± 1,04
	10	4,26 ± 0,15	9,13 ± 0,59	8,32 ± 0,59	5,08 ± 0,99	8,43 ± 0,78
	20	3,90 ± 0,36	8,97 ± 0,22	8,30 ± 0,84	6,26 ± 0,40	7,96 ± 0,49
	30	3,37 ± 0,09	8,41 ± 0,21	7,30 ± 0,37	5,69 ± 0,69	6,90 ± 0,61
	60	2,47 ± 0,31	7,92 ± 0,18	7,76 ± 0,16	6,58 ± 1,05	5,81 ± 0,70
	90	1,93 ± 0,41	7,88 ± 0,17	7,89 ± 0,19	6,15 ± 0,84	5,14 ± 0,38
Quesería 4	120	N.D.	7,43 ± 0,08	7,76 ± 0,12	6,21 ± 0,85	4,99 ± 0,49
	150	N.D.	7,03 ± 0,44	7,26 ± 0,29	5,96 ± 0,74	5,07 ± 0,38
	1	4,96 ± 0,45	6,86 ± 1,34	6,41 ± 0,90	5,12 ± 0,61	6,30 ± 0,79
	2	4,86 ± 0,33	8,97 ± 0,04	8,11 ± 0,70	5,89 ± 0,84	6,26 ± 0,91
	10	3,08 ± 0,08	8,79 ± 0,12	8,68 ± 0,09	6,94 ± 0,52	7,36 ± 0,43
	20	2,74 ± 0,69	8,40 ± 0,45	8,12 ± 0,21	6,72 ± 0,87	7,21 ± 0,21
	30	2,68 ± 0,38	8,47 ± 0,21	8,10 ± 0,12	6,23 ± 0,94	6,41 ± 1,10
	60	0,88 ± 0,36	7,90 ± 0,53	7,63 ± 0,44	6,07 ± 1,02	5,40 ± 0,46
Quesería 5	90	N.D.	7,35 ± 0,27	7,44 ± 0,27	6,27 ± 1,01	5,19 ± 0,48
	120	N.D.	7,99 ± 0,17	7,71 ± 0,17	6,24 ± 0,86	4,91 ± 0,32
	150	N.D.	8,15 ± 0,45	8,13 ± 0,43	6,17 ± 0,83	4,93 ± 0,24
	1	5,93 ± 1,41	6,68 ± 1,16	6,66 ± 1,14	5,77 ± 1,25	5,75 ± 1,03
	2	5,52 ± 1,17	8,90 ± 0,04	8,70 ± 0,08	5,55 ± 0,53	6,04 ± 0,79
	10	5,22 ± 1,05	8,13 ± 0,45	7,63 ± 0,96	6,06 ± 0,28	7,19 ± 0,63
	20	5,20 ± 1,11	8,79 ± 0,11	8,34 ± 0,58	6,76 ± 0,17	7,43 ± 0,10
	30	2,78 ± 1,43	8,38 ± 0,15	8,18 ± 0,06	6,21 ± 0,85	6,49 ± 1,02
	60	2,21 ± 0,83	8,18 ± 0,08	8,03 ± 0,14	6,40 ± 0,95	5,67 ± 0,60
	90	1,18 ± 0,53	8,01 ± 0,01	8,09 ± 0,06	6,25 ± 0,87	5,21 ± 0,44
	120	0,84 ± 0,34	7,61 ± 0,42	7,58 ± 0,55	5,75 ± 0,62	4,81 ± 0,24
	150	N.D.	7,84 ± 0,06	7,86 ± 0,02	6,18 ± 0,86	5,38 ± 0,45

n=número de quesos en cada estadio de maduración. N.D.= no detectado.

A partir de los datos, en forma de medias aritméticas para los parámetros fisicoquímicos y geométricas para los microbiológicos y errores standard que se indican en las dos tablas anteriores de estadística descriptiva, se han realizado los análisis estadísticos que se exponen en los apartados siguientes.

3.4.2. Evolución de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de los quesos a lo largo de la maduración

En la tabla 30 se muestran los niveles de significación estadística de los efectos quesería (Q) y tiempo de maduración (reflejado en los coeficientes de regresión lineal y cuadrático (b_1D y b_2D^2)), así como los coeficientes de determinación del modelo (ver método estadístico en material y métodos) aplicado a la estimación de dichos efectos para las variables: pH, extracto seco, materia grasa/extracto seco, flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos, leuconostoc y enterococos referidas a los quesos con Denominación de Origen elaborados en Navarra. En el modelo se consideró también el efecto de la Denominación, pero al no resultar significativo se eliminó este término. Así mismo, tampoco fue significativo el coeficiente de regresión cúbico.

Tabla 30.- Niveles de significación del efecto quesería (Q), de los coeficientes de regresión lineal (b_1D) y cuadrático (b_2D^2), y de sus interacciones con el efecto quesería ($Q \times b_1D$, $Q \times b_2D^2$) y coeficientes de determinación (R^2) para el pH, extracto seco (ES), materia grasa/extracto seco (M. Grasa/ES), mesófilos (Mes), enterobacterias (Entb), coliformes (Coli), lactococos (Lactc), lactobacilos (Lactb), leuconostoc (Leu) y enterococos (Entc).

	Q	b_1D	b_2D^2	$Q \times b_1D$	$Q \times b_2D^2$	R^2
pH	***	***	NS	NS	NS	0,47
ES	***	***	NS	NS	NS	0,81
M. Grasa/ES	***	NS	NS	NS	NS	0,30
Mes	***	***	**	*	NS	0,63
Entb	***	***	NS	**	NS	0,68
Coli	***	***	NS	*	NS	0,69
Lactc	***	***	***	*	NS	0,69
Lactb	***	***	*	NS	NS	0,34
Leu	NS	***	**	NS	NS	0,40
Entc	NS	***	NS	NS	NS	0,71

*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$; NS= $p > 0,05$.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para cada variable se estableció, cuando el coeficiente de determinación se consideró elevado (superior a 0,6), un modelo de predicción del parámetro para cada una de

las queserías, salvo cuando el efecto quesería no fue significativo (enterococos), caso en el que el modelo de predicción englobaba a todas las queserías.

3.4.2.1.- pH

De los resultados señalados en la tabla 30 para el pH, se deduce que existen diferencias significativas ($p \leq 0,001$) entre las queserías estudiadas y en función del tiempo de maduración ($p \leq 0,001$). El hecho de que la interacción sea no significativa supone que el pH más elevado que mostró la quesería 5, se manifestó en los nueve estadios de maduración estudiados y en la misma magnitud, ya que entre las queserías 1, 2 y 4 no se encontraron diferencias significativas.

En la figura 10 se representa la evolución del pH en función del tiempo de maduración en cada una de las cuatro queserías estudiadas. No se ha realizado el ajuste de las curvas debido a que no se ha encontrado ningún modelo matemático sencillo: simple, polinómico, exponencial o logarítmico, que permita predecir con fiabilidad en cada quesería los cambios del pH dependiendo del tiempo.

Como se puede apreciar en la figura 10, se produce un descenso del pH al comienzo de la maduración como consecuencia de la liberación de ácido láctico por las bacterias lácticas, tras el prensado de la cuajada, tal y como observaron Núñez (1978), Farkye y Fox (1990) y Fox y col. (1990). La disminución del pH presenta el primer mínimo en las queserías 1 y 2 en el queso salado, en la quesería 4 en los quesos de 10 días y en la quesería 5 en los de 20 días. El descenso de pH es más acusado en la quesería 4, pasando de un pH medio de 5,35 a un pH de 5,1 en los 10 primeros días. Este hecho provoca una mayor solubilidad del calcio y fosfato, lo que ejerce un efecto desestabilizador de las micelas al disminuir la retención de agua (Lucey y Fox, 1993). Cabe sugerir que ésta sea una de las causas que explique la textura más quebradiza que se ha observado en los quesos de esta quesería.

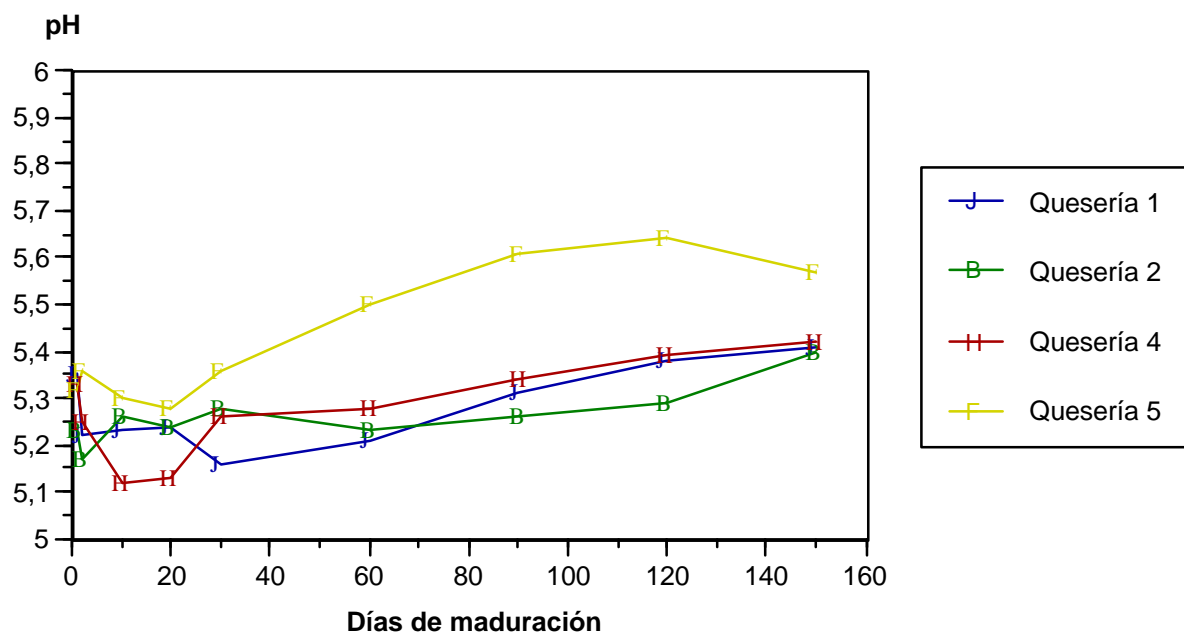


Figura 10.- Evolución del pH a lo largo del tiempo de maduración en las queserías 1, 2, 4 y 5.

A continuación tiene lugar un aumento del pH debido a la producción de lactato de calcio a partir del calcio retenido en la cuajada (Weber y Ramet, 1990; Oria y Sala, 1992). Es de destacar que las queserías 1 y 2, acogidas a la D.O. Idiazábal, muestran un segundo punto de inflexión a los 30 y 60 días respectivamente. Esta disminución de pH se justifica por la formación de ácido láctico a partir de la lactosa residual (McSweeney y Fox, 1993). Posiblemente los altos niveles de lactobacilos detectados en ambos estadios de la maduración puedan influir en este hecho, como ya indicó Núñez (1978).

En etapas posteriores de la maduración, se observa en todas las queserías un incremento del pH. Este se puede atribuir a la formación de compuestos nitrogenados alcalinos y a la metabolización del ácido láctico por algunos microorganismos, como las levaduras (Fernández del Pozo y col., 1989; Guindeo y col., 1990; González de Llano y col., 1992; McSweeney y Fox, 1993).

Los quesos de la quesería 5 experimentan el incremento de pH más acusado, pasando de 5,3 a los 20 días a 5,6 a los 120 días. Esta evolución del pH es considerada normal en quesos con una proteólisis intensa (Medina y col., 1991; Massa y col., 1994) y está de acuerdo con las señaladas por otros autores para quesos con D.O. Roncal (Ordóñez y col., 1980; Millán y col., 1992; Oria y Sala 1992).

El comportamiento del pH descrito en el presente estudio para las queserías 1 y 2 es similar al registrado por otros autores para los quesos con D.O. Idiazábal (Ibáñez y col., 1993; Pérez-Elortondo y col., 1993a; Ibáñez, 1994), aunque estos últimos encuentran valores medios algo inferiores. Cabe señalar que en los mencionados trabajos también se ha notado un descenso del pH entre los 30 y los 60 días del periodo de maduración.

En los siguientes tipos de quesos elaborados con leche cruda de oveja: La Serena (Fernández del Pozo y col., 1988; Medina y col., 1991), Urbasa (Guindeo y col., 1990), Manchego (Núñez y Martínez Moreno, 1976) y Torta del Casar (Poullet y col., 1991), se han indicado evoluciones de pH similares a las obtenidas en este estudio. En dichos trabajos, los valores medidos han resultado análogos a los constatados para las queserías 1, 2 y 4, e inferiores a los de la quesería 5.

3.4.2.2.- Extracto seco

Los resultados obtenidos para el porcentaje de extracto seco (tabla 30), indican que existen diferencias significativas entre las queserías estudiadas ($p \leq 0,001$) y en función del tiempo de maduración ($p \leq 0,001$). La interacción es así mismo no significativa.

En la figura 11, se representa la evolución del porcentaje de extracto seco dependiendo del tiempo de maduración en cada una de las cuatro queserías. Se ha realizado un ajuste de las curvas mediante un modelo matemático sencillo que permite describir el porcentaje de sólidos totales de los quesos de cada quesería en función del tiempo de maduración:

$$\%ES = a + bD$$

Donde: D toma valores entre 1 y 150 días, y a y b los señalados en la tabla 32 para cada una de las queserías.

Tabla 31.- Valores de la constante a, del coeficiente de regresión b y errores estandard, así como los coeficientes de determinación (R^2) para el porcentaje de extracto seco en las queserías 1, 2, 4 y 5 (Q1, Q2, Q4 y Q5 respectivamente) según el modelo: $\%ES = a + bD$, donde D toma valores entre 1 y 150 días.

Quesería	a	b	R ²
Q1	56,323 ± 0,612	0,081 ± 0,008	0,83
Q2	55,543 ± 0,616	0,098 ± 0,008	0,86
Q4	59,857 ± 0,499	0,089 ± 0,006	0,89
Q5	57,197 ± 1,051	0,076 ± 0,013	0,64

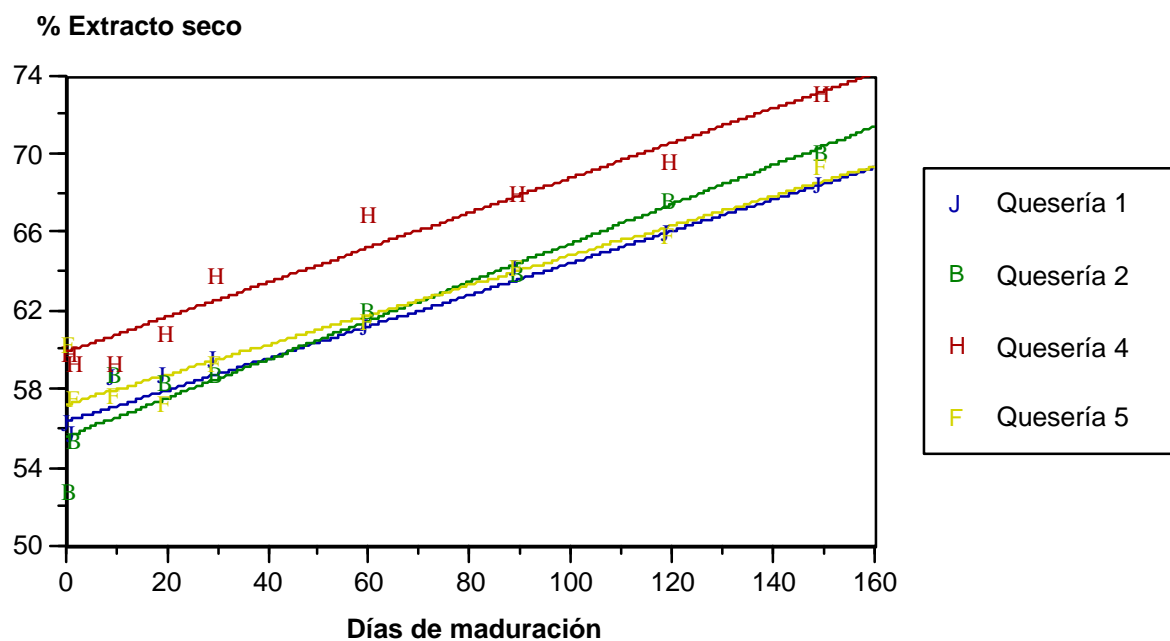


Figura 11.- Evolución del porcentaje de extracto seco a lo largo del tiempo de maduración en las queserías 1, 2, 4 y 5.

Como se puede apreciar en la figura 11, los quesos de la quesería 4 son los que presentan un contenido en sólidos totales más elevado a lo largo de toda la maduración, mientras que los de la quesería 5 muestra la variación más lenta de disminución de humedad (0,076% cada día). Esta diferencia entre ambas queserías corrobora la afirmación, comprobada estadísticamente, de que el efecto de la Denominación no resulta significativo.

Los quesos de la quesería 2 poseen el menor porcentaje de extracto seco en el momento del salado (55,32%), sin embargo muestran el incremento más rápido (0,098% por día).

El extracto seco de los quesos viene determinado por el grado de desuerado durante la fabricación. Cabe pensar que los quesos de la quesería 4 sean sometidos a un desuerado más intenso lo que justificaría, en parte, su mayor contenido en sólidos totales. Por otro lado, las posibles variaciones en las condiciones ambientales durante el periodo de maduración podrían explicar los diferentes comportamientos entre las queserías respecto a la variación del contenido de sólidos totales (Oria y Sala, 1992).

Así mismo, hay que destacar que en todas las queserías, con excepción de la 5, el incremento más acusado del porcentaje de extracto seco tiene lugar durante los primeros 30 días de la maduración. Este se produce como consecuencia del proceso de salazón y de la difusión de la sal hacia el interior del queso (Gaya y col., 1986; Guinnee y Fox, 1987; Ibáñez y col., 1993).

Las evoluciones de los porcentajes de extracto seco obtenidas en el presente trabajo para los quesos elaborados en las queserías 1 y 2, son bastante similares a las constatadas por otros autores para quesos con D.O. Idiazábal (Ibáñez, 1993; Pérez-Elortondo y col., 1993a). Así mismo, la variación de dicho parámetro en la quesería 5 está de acuerdo con estudios realizados para quesos acogidos a la D.O. Roncal, mientras que la quesería 4 muestra un contenido en sólidos más elevado (Ordóñez y col., 1980; Oria y Sala, 1992).

En otros tipos de quesos de oveja, se han observado menores pérdidas de agua a lo largo de la maduración, aunque hay que tener en cuenta que éstos normalmente se analizan durante un intervalo de tiempo más corto, y por lo tanto no describen el contenido en sólidos en estadios avanzados de la maduración (Núñez y Martínez-Moreno, 1976; Fernández del Pozo y col., 1988a; Medina y col., 1991; Pouillet y col., 1991; Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993).

3.4.2.3.- Materia grasa

A la vista de los resultados que se indican en la tabla 30 para el porcentaje de materia grasa, expresado sobre extracto seco (% M. Grasa/ES), se deduce que existen diferencias significativas ($p \leq 0,001$) entre las queserías estudiadas, siendo la variación de este parámetro a lo largo de la maduración no significativa.

En la figura 12, se representa el contenido de materia grasa sobre extracto seco en las 4 queserías. Las variaciones que se observan a lo largo del tiempo se atribuyen a las características individuales específicas de cada queso.

El hecho de que el efecto del tiempo de maduración y de la interacción quesería-tiempo sean no significativas, permite agrupar los quesos de cada quesería y así obtener suficientes datos para poder comparar las queserías mediante un análisis de comparaciones múltiples (tabla 32).

Tabla 32.- Valores medios y sus errores estandar de la variable materia grasa/extracto seco (M. Grasa/ES) de los quesos de cuatro queserías: dos acogidas a la D.O. Idiazábal (Q1 y Q2) y dos a la D.O. Roncal (Q4 y Q5). Comparación entre queserías mediante anova de una vía (asteriscos) y contrastes (letras) utilizando el test de Duncan.

	Queserías				
	Q1	Q2	Q4	Q5	
M. grasa/ES (%)	54,26±0,70 ^{bc}	53,35±0,56 ^{ab}	55,22±0,43 ^c	52,52±0,83 ^a	***

***= $p \leq 0,001$. Letras iguales = $p > 0,05$; letras distintas = $p \leq 0,05$.

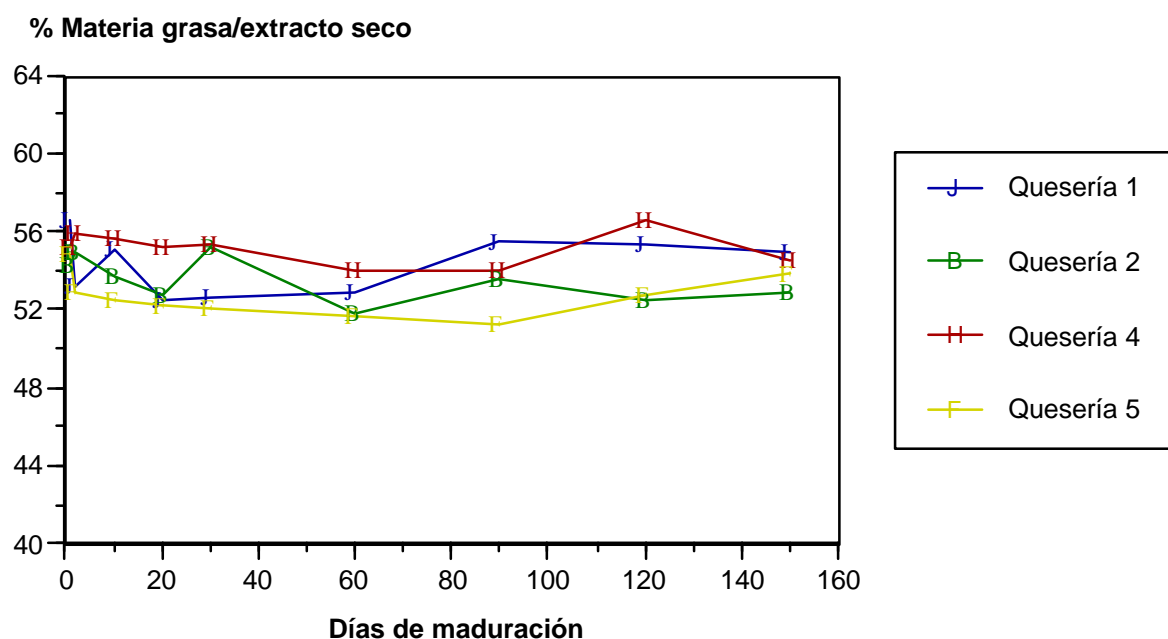


Figura 12.- Evolución del contenido en materia grasa, expresado sobre extracto seco, a lo largo del tiempo de maduración en las queserías 1, 2, 4 y 5.

La quesería 4 elabora los quesos en los que se ha medido mayor contenido en materia grasa respecto al extracto seco (55,22%), aunque no presenta diferencias significativas con la quesería 1. Ambas fabrican los quesos con la leche de mayor contenido en materia grasa, lo que confirma la correlación, que se ha encontrado para este parámetro entre la leche y los quesos. Así mismo, cabe destacar que las diferencias más notables se han encontrado entre las queserías 4 y 5, ambas adscritas a la D.O. Roncal.

Los valores obtenidos en este trabajo para los quesos con D.O. Idiazábal son similares a los obtenidos por Millán y col. (1991) y considerablemente inferiores (aproximadamente en un 4%) a los descritos por Ibáñez (1994) para este mismo tipo de queso. Este autor tampoco encontró variación del contenido de materia grasa respecto al extracto seco en función del tiempo de maduración. Por otra parte, los valores encontrados para la quesería 5 son análogos a los indicados por Millán y col. (1992), mientras que tanto esta quesería como la 4 muestran valores muy superiores a los señalados por Ordóñez y col. (1980) para quesos con D.O. Roncal.

3.4.2.4.- Flora aerobia mesófila

Los resultados obtenidos para el recuento de la flora aerobia mesófila (tabla 30), indican que existen diferencias significativas entre las queserías ($p \leq 0,001$) y en función del tiempo de maduración ($p \leq 0,001$ y $p \leq 0,01$ para el coeficiente de regresión lineal y cuadrático respectivamente). La interacción del término lineal con el efecto quesería es también significativa ($p \leq 0,05$).

En la figura 13 se representa la evolución de la flora aerobia mesófila en función del tiempo de maduración. El hecho de que el efecto quesería sea significativo no permite proponer un mismo modelo de predicción de la evolución del número de mesófilos válido para todas las queserías. Por ello, se ha realizado un ajuste de las curvas para cada quesería mediante el siguiente modelo polinómico de segundo grado:

$$\text{Flora aerobia mesófila (log ufc/g)} = a + b_1D + b_2D^2$$

Donde D: toma valores entre 1 y 150 días y a, b_1 y b_2 los señalados en la tabla 33, para cada una de las queserías.

Tabla 33.- Valores de la constante a, de los coeficientes de regresión b_1 y b_2 y errores standard, así como los coeficientes de determinación (R^2) para el recuento de mesófilos en las queserías 1, 2, 4 y 5 (Q1, Q2, Q4 y Q5 respectivamente) según el modelo: Flora aerobia mesófila ($\log \text{ ufc/g}$) = $a + b_1D + b_2D^2$, donde D toma valores entre 1 y 150 días.

Quesería	a	b ₁	b ₂	R ²
Q1	9,151 ± 0,171	-0,022 ± 0,007	0,6.10 ⁻⁴ ± 0,4.10 ⁻⁵	0,70
Q2	9,333 ± 0,244	-0,026 ± 0,009	0,6.10 ⁻⁴ ± 0,6.10 ⁻⁵	0,69
Q4	9,050 ± 0,252	-0,031 ± 0,009	1,5.10 ⁻⁴ ± 0,6.10 ⁻⁵	0,50
Q5	8,657 ± 0,102	-0,011 ± 0,004	0,3.10 ⁻⁴ ± 0,2.10 ⁻⁴	0,67

Valores expresados en log ufc/g.

Hay que hacer notar que los coeficientes de determinación no son muy elevados, lo cual cabía esperar al tratarse de variables microbiológicas, y por lo tanto la predicción no sería del todo exacta.

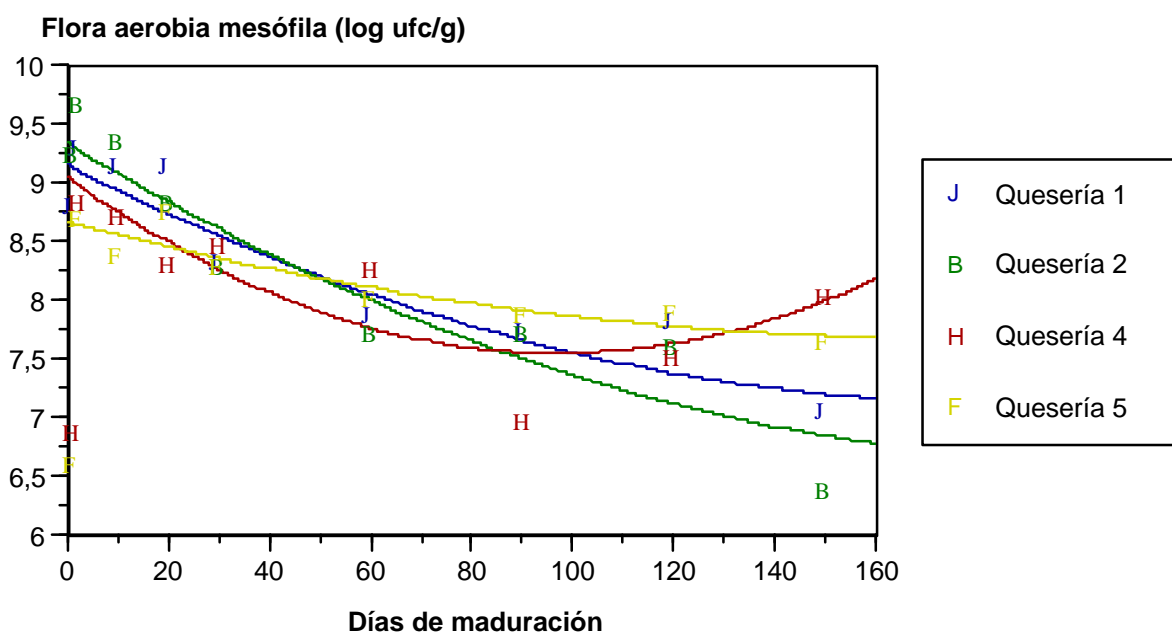


Figura 13.- Evolución de la flora aerobia mesófila a lo largo del tiempo de maduración en las queserías 1, 2, 4 y 5.

Con relación a la figura 13, se observa un aumento de la flora aerobia mesófila durante los dos primeros días. A continuación y hasta los 60 días de maduración se produce, en las queserías 1, 2 y 5, una disminución progresiva. Entre los 60 y los 120 días el nivel se mantiene bastante estable, detectándose un nuevo descenso entre los 120 y los 150 días. En la quesería 4, la disminución inicial es más acusada que en las otras tres y, a

partir de los 90 días tiene lugar un incremento que se corresponde con un aumento del nivel de lactococos y lactobacilos (apartado 3.4.2.6.) y se justifica porque estos microorganismos constituyen la fracción cuantitativamente más importante de la flora mesófila (Núñez, 1978; Poulet, 1991).

El recuento de los mesófilos mostró un comportamiento similar al descrito por otros autores para quesos con D.O. Idiazábal de hasta 60 días de maduración (Barcina y col., 1988; Pérez-Elortondo y col., 1993a). Resultados análogos se han indicado para otros tipos de quesos de oveja (Núñez y Martínez-Moreno, 1978; Fernández del Pozo y col., 1988a, 1989; Guindeo y col., 1990; Poulet y col., 1991).

3.4.2.5.- Enterobacterias y Coliformes

De los resultados señalados en la tabla 30 para los recuentos de enterobacterias y coliformes, se deduce que existen diferencias significativas ($p \leq 0,001$) entre las queserías y en función del tiempo de maduración ($p \leq 0,001$ para el coeficiente de regresión lineal).

En las figuras 14 y 15 se representan las evoluciones de enterobacterias y coliformes respectivamente, a lo largo del periodo de maduración. Ambos grupos muestran una evolución semejante, como ya señalaron Pérez-Elortondo y col. (1993a), ya que los coliformes constituyen la mayor proporción de las enterobacterias en los quesos. Se ha realizado un ajuste de las curvas con el fin de proponer un modelo de predicción para cada evolución, mediante los siguientes modelos lineales:

$$\text{Enterobacterias (log ufc/g)} = a + bD$$

$$\text{Coliformes (log ufc/g)} = a + bD$$

Donde D: toma valores entre 1 y 150 días para la quesería 1, entre 1 y 120 días para las queserías 2 y 5 y entre 1 y 90 días para la quesería 4; y a y b los señalados en la tabla 34 para cada quesería y género microbiano. Es necesario tener en cuenta que los ajustes se han realizado para el intervalo de tiempo comprendido entre el día 1 y el momento de la maduración a partir del cual los recuentos se hacían nulos.

Tabla 34.- Valores de la constante a, del coeficiente de regresión b y errores estandard, así como los coeficientes de determinación (R^2) para el recuento de enterobacterias y coliformes en las queserías 1, 2, 4 y 5 (Q1, Q2, Q4 y Q5 respectivamente) según el modelo: enterobacterias/coliformes (log ufc/g) = $a + bD$, donde D toma valores entre 1 y 150 días para la quesería 1, entre 1 y 120 días para las queserías 2 y 5 y entre 1 y 90 días para la quesería 4.

Quesería	Género	a	b	R^2
Q1	Enterobacterias	$4,022 \pm 0,231$	$-0,024 \pm 0,003$	0,72
Q1	Coliformes	$4,469 \pm 0,133$	$-0,032 \pm 0,002$	0,93
Q2	Enterobacterias	$4,427 \pm 0,208$	$-0,035 \pm 0,003$	0,83
Q2	Coliformes	$4,479 \pm 0,145$	$-0,034 \pm 0,002$	0,91
Q4	Enterobacterias	$4,375 \pm 0,280$	$-0,053 \pm 0,006$	0,82
Q4	Coliformes	$4,264 \pm 0,271$	$-0,052 \pm 0,006$	0,82
Q5	Enterobacterias	$5,141 \pm 0,613$	$-0,042 \pm 0,010$	0,52
Q5	Coliformes	$4,952 \pm 0,615$	$-0,041 \pm 0,010$	0,51

Valores expresados en log ufc/g.

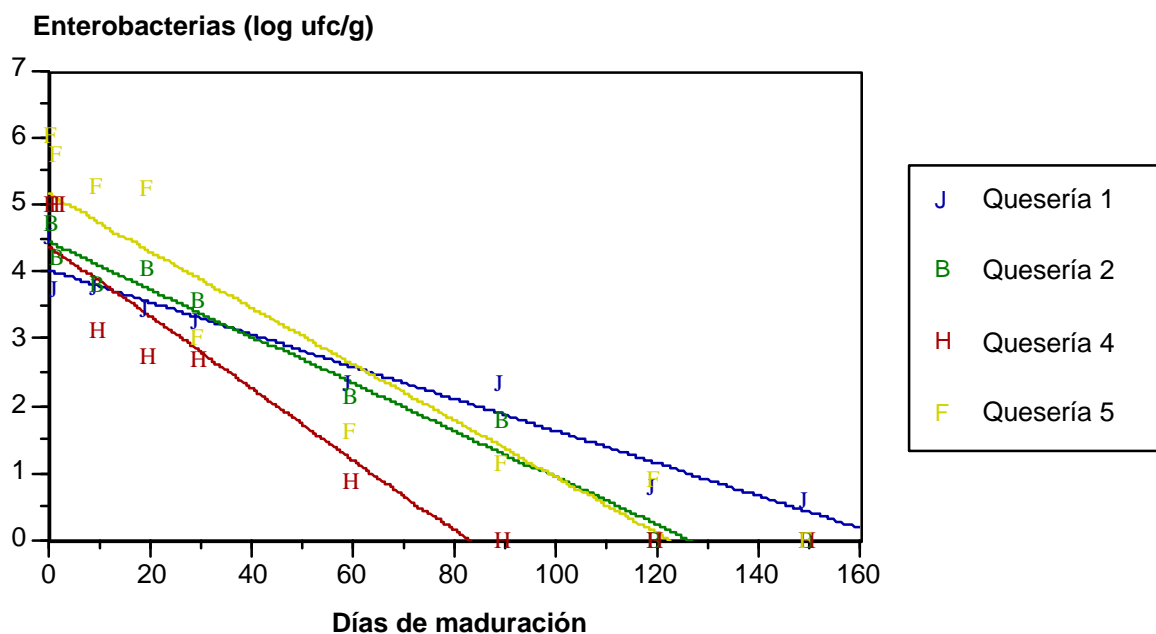


Figura 14.- Evolución de las enterobacterias a lo largo del tiempo de maduración en las queserías 1, 2, 4 y 5.

Se puede observar cómo en las queserías en las que inicialmente se encontraba el nivel de enterobacterias y coliformes más alto (4 y 5), se produce el descenso más rápido. Por otra parte, es de destacar que en la quesería 4 no se han detectado estos microorganismos en ningún queso con más de 90 días de maduración. Algunos autores (Gaya y col., 1983; Bengoechea, 1989) han observado que la disminución inicial del pH inhibe el crecimiento de las enterobacterias. Este hecho lleva a sugerir que el descenso de pH durante los 10 primeros días de maduración (de 5,35 a 5,10), más acusado en la quesería 4 que en las otras tres queserías estudiadas, contribuya a la desaparición de estas bacterias en estadios anteriores.

La evolución de las enterobacterias y coliformes descrita para la quesería 4, está de acuerdo con la señalada por Ordóñez y col. (1980) para quesos acogidos a la D.O. Roncal; mientras que la quesería 5 presenta valores iniciales más elevados (del orden de 5,5) y una desaparición más lenta.

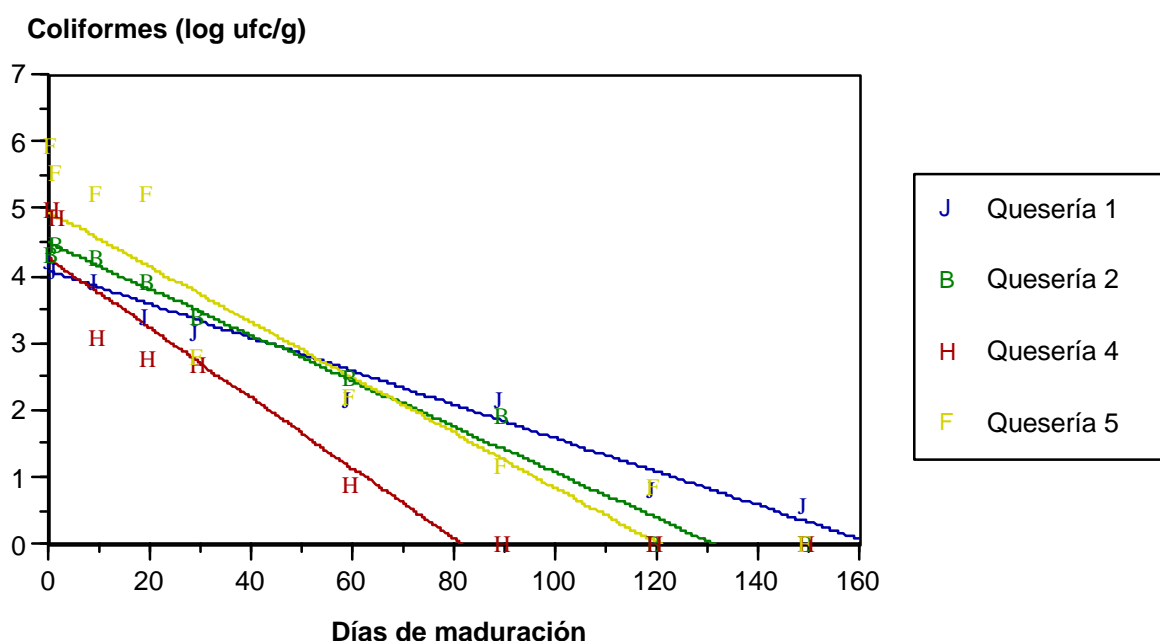


Figura 15.- Evolución de los coliformes a lo largo del tiempo de maduración en las queserías 1, 2, 4 y 5.

El comportamiento de ambos grupos microbianos en las queserías 1 y 2, concuerda con el obtenido por Barcina y col. (1988) para quesos adscritos a la D.O. Idiazábal. Sin embargo, Pérez-Elortondo y col. (1993a) constataron, para el mismo tipo de queso, la desaparición de enterobacterias y coliformes a partir de los 30 días de maduración. Esta diferencia en los resultados, se podría explicar por el menor pH que presentaron éstos últimos a los 10 días de maduración. Este hecho corrobora, como se ha mencionado anteriormente, que el

descenso inicial de pH y la utilización de fermentos inhiben el desarrollo de la flora no deseable (Gaya y col. 1983, 1984). Por otro lado, un exceso de acidez tampoco es aconsejable ya que, podría interferir en las reacciones químicas y bioquímicas que tienen lugar durante la maduración (Brule y Lenoir, 1990).

En otras variedades de quesos, elaborados con leche cruda de oveja, se han registrado niveles de enterobacterias y coliformes superiores a los encontrados en el presente trabajo (Núñez y Martínez-Moreno, 1976; Fernández del Pozo y col., 1988a; González Crespo y col., 1990; Poulet y col., 1991).

3.4.2.6.- Lactococos y Lactobacilos

Los resultados señalados en la tabla 30 para los lactococos y lactobacilos, indican que existen diferencias significativas entre las queserías ($p \leq 0,001$) y en función del tiempo de maduración ($p \leq 0,001$ para el coeficiente de regresión lineal y $p \leq 0,001$ (lactococos) y $p \leq 0,05$ (lactobacilos) para el cuadrático). La interacción del termino lineal con el efecto quesería es significativa ($p \leq 0,05$) para los lactococos.

En la figura 16, se representa la evolución de los lactococos a lo largo del periodo de maduración. Se ha realizado un ajuste de la curvas, con el fin de proponer un modelo de predicción de la evolución del número de lactococos para cada quesería, mediante el siguiente modelo polinómico de segundo grado:

$$\text{Lactococos (log ufc/g)} = a + b_1D + b_2D^2$$

Donde D: toma valores entre 1 y 150 días y a, b_1 y b_2 los señalados en la tabla 35, para cada una de las queserías.

Tabla 35.- Valores de la constante a, de los coeficientes de regresión b_1 y b_2 y errores estandar, así como los coeficientes de determinación (R^2) para el recuento de lactococos en las queserías 1, 2, 4 y 5 (Q1, Q2, Q4 y Q5 respectivamente) según el modelo: $\text{Lactococos (log ufc/g)} = a + b_1D + b_2D^2$, donde D toma valores entre 1 y 150 días.

Quesería	a	b_1	b_2	R^2
Q1	$9,204 \pm 0,138$	$-0,018 \pm 0,005$	$0,3 \cdot 10^{-4} \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$	0,79
Q2	$9,385 \pm 0,177$	$-0,028 \pm 0,007$	$0,8 \cdot 10^{-4} \pm 0,5 \cdot 10^{-5}$	0,76
Q4	$9,136 \pm 0,210$	$-0,029 \pm 0,008$	$1,4 \cdot 10^{-4} \pm 0,5 \cdot 10^{-5}$	0,50
Q5	$8,790 \pm 0,141$	$-0,012 \pm 0,005$	$0,4 \cdot 10^{-4} \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$	0,56

Valores expresados en log ufc/g.

Hay que tener en cuenta que los coeficientes de determinación no son muy elevados, sobre todo para las queserías 4 y 5, lo que indica que existen otros factores no controlados que influyen en la variabilidad del número de lactococos. Este hecho dificulta la predicción del comportamiento de estos microorganismos.

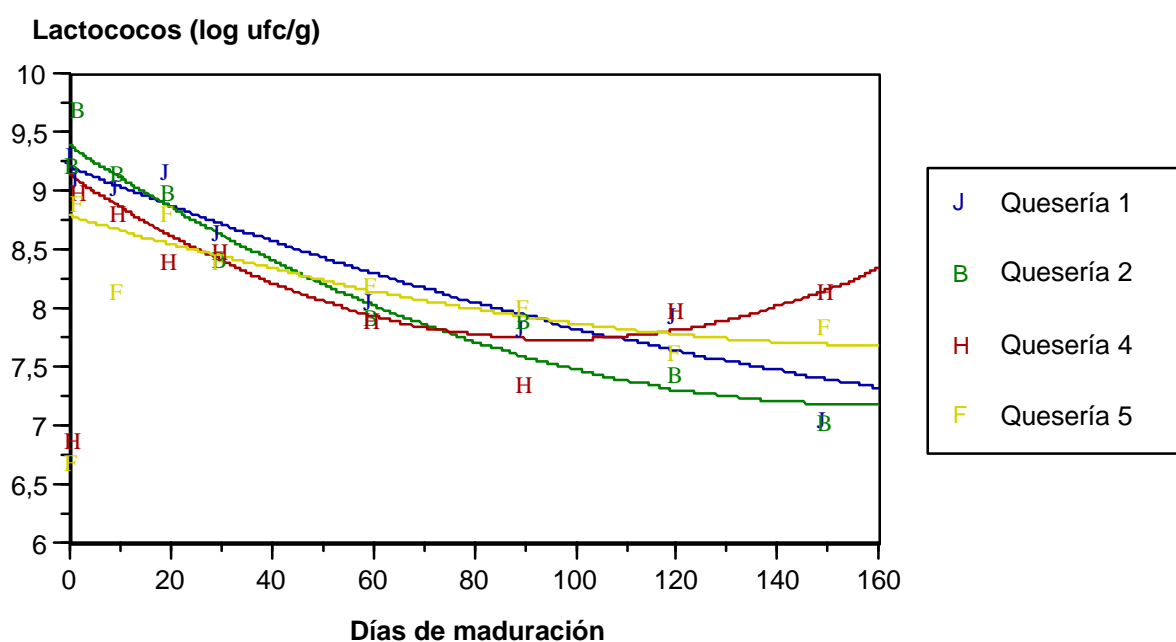


Figura 16.- Evolución de los lactococos a lo largo del tiempo de maduración en las queserías 1, 2, 4 y 5.

La variación del recuento de lactococos a lo largo de la maduración sigue un comportamiento análogo al señalado para la flora aerobia mesófila (apartado 3.4.2.4.). Se aprecia un incremento muy acusado hasta el día dos, como consecuencia de la adición de fermentos. A continuación, tiene lugar una disminución hasta los 60 días. En las queserías 1 y 2, el nivel se mantiene bastante constante entre los 60 y los 120 días detectándose un ligero descenso al final del periodo estudiado. Sin embargo, en las queserías 4 y 5 se ha constatado un incremento a partir de los 90 y 120 días respectivamente. En los quesos de 150 días, el número de lactococos de las queserías 4 y 5 es superior al que presentan las queserías 1 y 2.

En la figura 17, se representa la evolución de los lactobacilos en función del tiempo de maduración. No se han realizado ajustes de las curvas, debido a que no se ha encontrado ningún modelo matemático sencillo de predicción de la evolución del número de lactobacilos, que ofrezca coeficientes de determinación superiores a 0,40.

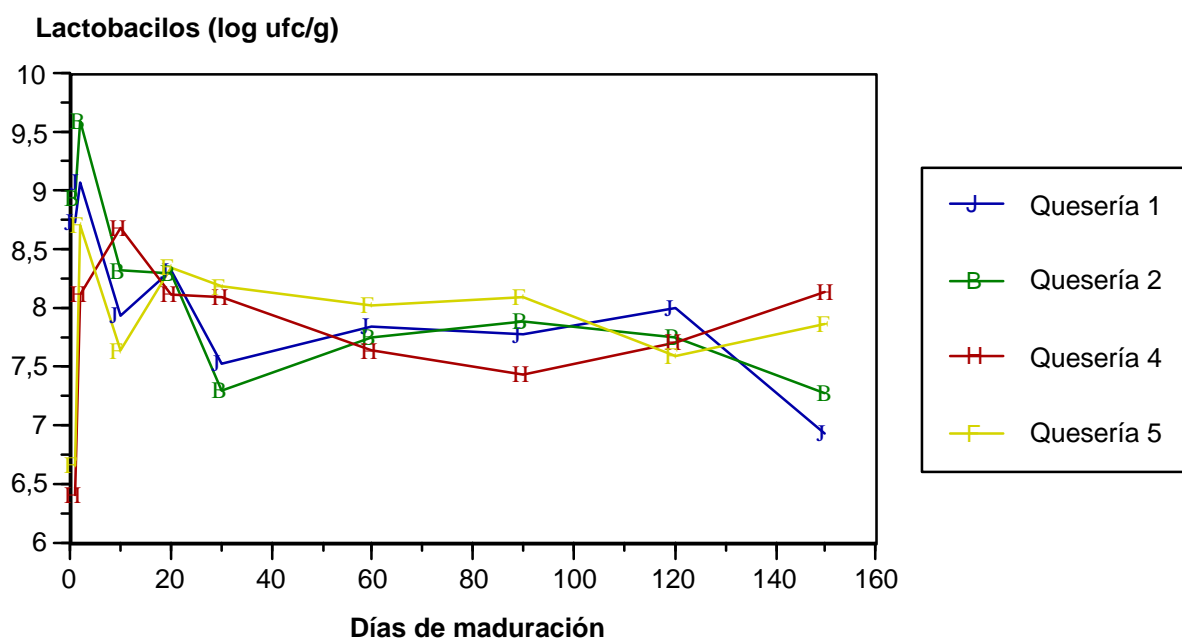


Figura 17.- Evolución de los lactobacilos a lo largo del tiempo de maduración en las queserías 1, 2, 4 y 5.

A grandes rasgos, el comportamiento de los lactobacilos es similar al de los lactococos, lo que coincide con los resultados descritos en la bibliografía (Ramos y col., 1982; Pérez-Elortondo y col., 1993a). Sin embargo, considerando intervalos de tiempo más cortos, se han observado algunas diferencias. Al principio de la maduración, el nivel de lactococos es superior al de los lactobacilos. En etapas posteriores el ácido láctico liberado produce una disminución del pH, lo que estimula la proliferación de los lactobacilos, como ya señalaron Suárez y col. (1984a). A partir de los 30-60 días de maduración los recuentos de ambos géneros se igualan, llegando incluso a ser superior el de los lactobacilos. Este hecho ya ha sido señalado anteriormente tanto en el queso Idiazábal (Pérez-Elortondo y col., 1993a), como en otros tipos de quesos de oveja (Poullet y col., 1991; Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993) y corrobora la afirmación de que los lactobacilos proliferan con facilidad y persisten en el queso hasta estadios avanzados de maduración (Ordóñez y col., 1980; Suárez y col., 1983).

Los resultados constatados en el presente trabajo para los niveles de lactococos en las queserías 4 y 5, difieren de los descritos por Ordóñez y col. (1980) para quesos con D.O. Roncal, ya que éstos encontraron diferencias entre los lactococos y los lactobacilos, de aproximadamente dos unidades logarítmicas, durante todo el periodo de maduración. Por otra parte en quesos con D.O. Idiazábal (Pérez-Elortondo y col., 1993a) y en otros tipos de quesos de oveja (Núñez y Martínez-Moreno, 1976; Fernández del Pozo y col., 1988a, 1989;

Guindeo y col., 1990; Poulet y col., 1991), se han indicado resultados análogos a los señalados en este estudio, aunque en dichos trabajos se estudia la evolución de los quesos únicamente hasta los 60 días de maduración.

3.4.2.7.- Leuconostoc

En relación con los resultados que se muestran en la tabla 30 para el recuento de leuconostoc, se deduce que las diferencias entre queserías son no significativas, existiendo diferencias significativas en función del tiempo de maduración ($p \leq 0,001$ y $p \leq 0,01$ para el coeficiente de regresión lineal y cuadrático, respectivamente). Las interacciones no son significativas.

En la figura 18 se representa la evolución de los leuconostoc dependiendo del tiempo de maduración. El hecho de que el efecto quesería sea no significativo permitiría en un principio proponer un solo modelo matemático de predicción de la evolución del número de leuconostoc para todas las queserías. Sin embargo, no se ha considerado dicha ecuación, ya que presentaba un coeficiente de determinación muy bajo (0,39).

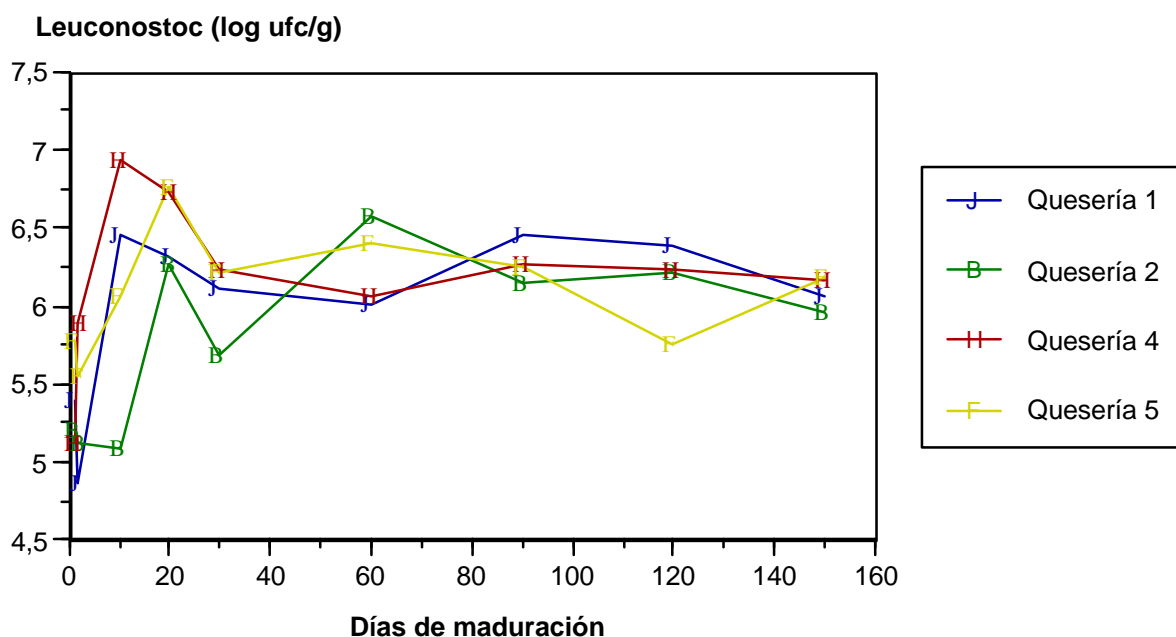


Figura 18.- Evolución de los leuconostoc a lo largo del tiempo de maduración en las queserías 1, 2, 4 y 5.

Cabe destacar el acusado incremento (aproximadamente de 1,5 unidades logarítmicas) que se produce durante el primer medio mes de la maduración. Este hecho corrobora la hipótesis de que los leuconostoc

proliferan cuando aumenta la acidez del medio, como consecuencia del metabolismo de los lactococos (Vedamuthu, 1994). En estadios posteriores, el nivel se mantiene bastante estable, oscilando durante todo el periodo de maduración en un intervalo comprendido entre 5,75 y 6,5 (expresado en log ufc/g).

Resultados análogos a los del presente trabajo se han descrito para el queso Manchego (Núñez y Martínez-Moreno, 1976). Por otro lado, en otros quesos de oveja (Pouillet y col., 1991; Fernández del Pozo y col., 1988a, 1989) se han encontrado valores bastante superiores, alcanzando en algunos momentos recuentos comprendidos entre 10^8 y 10^9 ufc/g.

3.4.2.8.- Enterococos

Los resultados señalados en la tabla 30 para los enterococos, indican que las diferencias entre queserías son no significativas, existiendo diferencias significativas en función del tiempo de maduración ($p \leq 0,001$) para el coeficiente de regresión lineal). La interacción es así mismo no significativa.

En la figura 19, se representa la evolución de los enterococos dependiendo del tiempo de maduración. Se propone un único modelo de predicción de la evolución del número de enterococos para las cuatro queserías estudiadas:

$$\text{Enterococos (log ufc/g)} = a + bD$$

Donde: D toma valores entre 1 y 150 días, y a y b los señalados en la tabla 36.

Tabla 36.- Valor de la constante a, del coeficiente de regresión b y errores estandard, así como los coeficientes de determinación (R^2) para el recuento de enterococos en las queserías 1, 2, 4 y 5 (Q1, Q2, Q4 y Q5 respectivamente), según el modelo: Enterococos (log ufc/g) = a + bD, donde D toma valores entre 1 y 150 días.

Quesería	a	b	R^2
Q1, Q2, Q4 y Q5	$7,654 \pm 0,145$	$-0,020 \pm 0,002$	0,71

Como se puede apreciar en la figura 19, el modelo no es muy exacto para predecir el nivel de enterococos en los quesos durante los 10 primeros días de la maduración. En este estadio tan temprano se observa un aumento de estos microorganismos, ya que poseen la habilidad de crecer y desarrollarse fácilmente aún en condiciones adversas (Mundt, 1986; Hegazi, 1990a). A partir de los 10 días de maduración y hasta los 120-150 días se produce una disminución del número, aunque el hecho de que los recuentos no sean en ningún momento inferiores a 10^5 ufc/g, permitiría considerar que puedan ejercer un papel en la maduración del queso, como ya se ha indicado en algunos trabajos (Ordóñez y col., 1978b; Trovatelli y col., 1987; Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993).

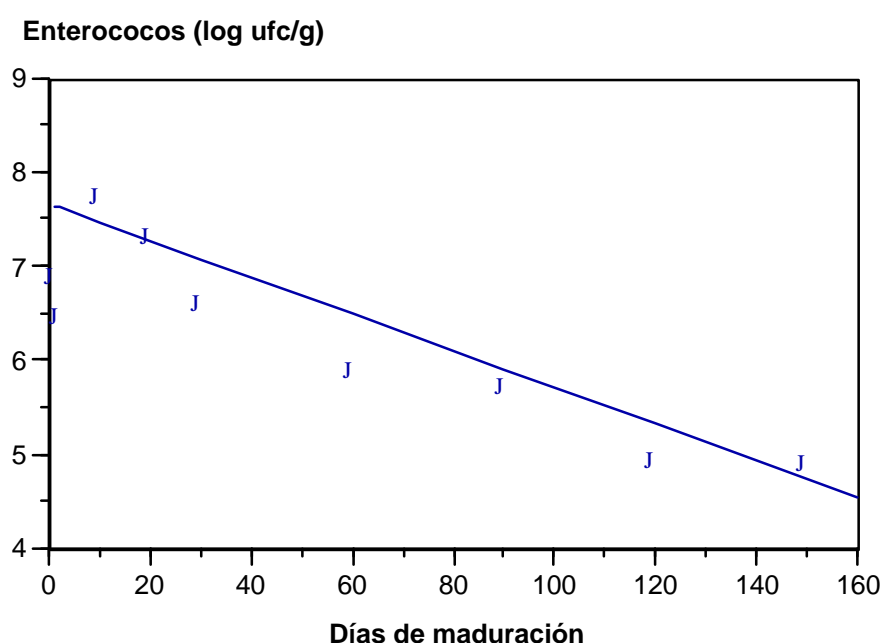


Figura 19.- Evolución de los enterococos a lo largo del tiempo de maduración en las queserías 1, 2, 4 y 5.

Varios autores han encontrado evoluciones de enterococos similares a las descritas en el presente trabajo, tanto para quesos con D.O. Idiazábal (Pérez-Elortondo y col., 1993a) como para otros tipos de quesos de oveja (Iñigo y col., 1986; Thomson y Marth, 1986; Pouillet, 1991; Litopoulou-Tzanetaki y col., 1993).

3.5.- Identificación de lactococos

Se identificaron 300 cepas de estreptococos de muestras de leche y quesos de 2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 150 días de maduración aisladas de placas de agar M 17 (Bioser®).

Las 300 cepas se describieron como cocos Gram positivos, con una disposición en pares o cadenas, catalasa negativos y de metabolismo homofermentativo según la clasificación de Sharpe (1979) y Orvin (1986b) en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

A continuación se realizaron las pruebas fisiológicas detalladas en la tabla 37 siguiendo los criterios de Orvin (1986b) y Hernández y Dubón (1992b). Es necesario tener en cuenta que, no todas las cepas incluidas en una especie se ajustaron exactamente a las características fisiológicas de la cepa típica. El criterio adoptado para integrar una cepa en una especie fue que no difiriese en más de dos pruebas fisiológicas con respecto a la cepa tipo.

La capacidad de las cepas para crecer a temperatura de 45 °C y/o con concentraciones salinas del 6,5% fueron determinantes para diferenciar las cepas adscritas al género *Lactococcus* de las pertenecientes al género *Enterococcus*, de acuerdo a la nueva clasificación de Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) y Schleifer y col. (1985). De esta manera 37 cepas se ubicaron dentro del género *Enterococcus* y 263 (87,7%) en el género *Lactococcus*.

Dentro del género *Lactococcus* se describieron tres especies: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

Ninguna cepa incluida en estas especies redujo el TTC (cloruro trifeniltetrazolio) al 0,01% y sin embargo un 93,9% redujo el azul de metileno.

Por otra parte, mientras ninguna cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* dió positivas las pruebas de crecimiento a 40 °C, desaminación de la arginina y fermentación del citrato, todas las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* resultaron positivas para dichas pruebas. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ocupó una posición intermedia, ya que aunque ninguna cepa fermentó el citrato, un 92,9% creció a temperatura de 40 °C y un 97% produjo amoníaco a partir de la arginina.

Tabla 37.- Características fisiológicas de las cepas de lactococos aisladas (1) de 4 queserías con D.O. Idiazábal (Q1, Q2, Q3 y Q7) y de 2 con D.O. Roncal (Q4 y Q5).

PRUEBAS	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>
---------	--	---	---

	Q1	Q2	Q3	Q7	Q4	Q5	Q1	Q2	Q3	Q7	Q4	Q5	Q1	Q2	Q3	Q7	Q4	Q5
n° de cepas	36	34	34	31	37	26	3	9	8	15	10	15	2	1	0	1	0	1
Crecimiento:																		
40°C	32	33	30	28	36	25	-	-	-	-	-	-	+	+		+		+
45°C	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-		-
CINa 6,5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-		-
Reducción de:																		
TTC 0,01% (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-		-
azul de metileno	35	+	33	+	34	+	2	+	4	+	4	+	+	+		+		+
0,1%																		
Desaminación																		
de la arginina	35	+	33	30	34	+	-	-	-	-	-	-	+	+		+		+
Acido de:																		
glucosa	+	+	33	30	35	+	+	+	5	+	+	+	+	+		+		+
maltosa	35	32	31	30	32	25	-	1	1	-	-	1	+	+		+		+
lactosa	+	+	33	30	36	24	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+
rafinosa	3	1	-	1	-	2	-	-	2	3	2	1	-	1		-		-
Fermenta el																		
citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		+		+

Los números indican el número de cepas positivas para la prueba.

+ Todas las cepas son positivas para la prueba.

- Todas las cepas son negativas para la prueba.

(2).- Cloruro trifeniltetrazolio

Con respecto a la producción de ácido a partir de distintos carbohidratos cabe señalar que la glucosa fue utilizada por todas las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, un 95% de las de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y un 98% de las cepas incluidas en la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Todas las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* produjeron ácido a partir de la maltosa, el porcentaje fue muy elevado (93,4%) entre las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, mientras que en el caso de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* disminuyó a un 5%

La lactosa fue fermentada por todas las especies excepto por un 2,5% de las especies de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

La rafinosa fue el azúcar menos utilizado, únicamente el 3,5% de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, el 13,3% de las de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y el 20% de las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* dieron resultados positivos.

Un 12% del total de cepas identificadas se incluyeron en el género *Enterococcus*. Este porcentaje, que en sí mismo es elevado, alcanza todavía un mayor relieve al considerar que el medio de aislamiento utilizado no es selectivo para este género bacteriano. Las principales causas de la alta presencia de enterococos pueden ser la falta de higiene en el ordeño, transporte o elaboración y la habilidad de estas bacterias para adaptarse a situaciones adversas: concentraciones salinas altas, temperaturas elevadas (Suárez y col., 1983; Ordóñez y col., 1988; Hegazi, 1990a). En el apartado 3.8. se estudiará con mayor profundidad este grupo, por considerarlo importante en quesos elaborados con leche cruda.

3.5.1.- Comparación entre Denominaciones

En la figura 20, se representan los porcentajes de las distintas especies de lactococos.

No se han encontrado diferencias significativas entre ambas Denominaciones en cuanto a la distribución de especies. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, con un porcentaje superior al 70%, es la especie mayoritaria. El porcentaje de *Lactococcus*

lactis subsp. *cremoris* es del 28,1% en la D.O. Roncal y del 20,1% en la D.O. Idiazábal. Esta diferencia no es significativa, pese a ser algo superior a las descritas para otras especies.

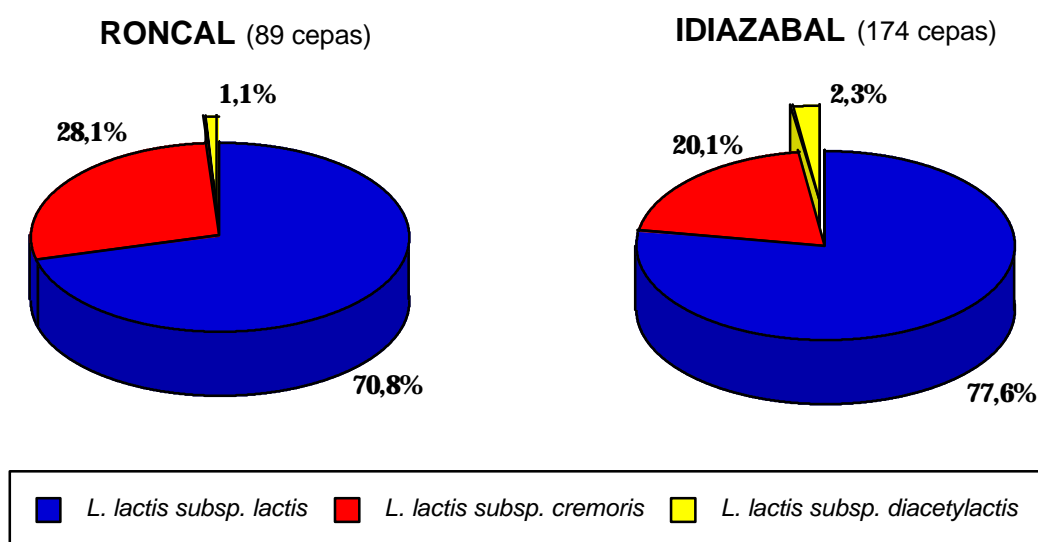


Figura 20.- Porcentaje de especies en 263 cepas de lactococos aisladas de leche y quesos procedentes de 6 queserías: 2 con D.O. Roncal y 4 con D.O. Idiazábal.

A pesar de que los fermentos incluyen las especies *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, la frecuencia de esta última en ambas Denominaciones ha resultado ser bastante menor. Este hecho, que resulta sorprendente, ha sido constatado por varios autores (Fontecha y col., 1994).

Se han sugerido tres hipótesis como posibles explicaciones:

- La concentración de *L. lactis* subsp. *cremoris* es más baja, bien porque en la leche cruda sea menor, bien por que se añaden en menor proporción en los fermentos, y al realizarse los aislamientos a partir de placas procedentes de diluciones altas no se detectan (Ordóñez y col., 1980).
- Aparecen fenómenos de competencia entre las dos especies durante la coagulación de la leche, que permiten la proliferación de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Fontecha y col., 1994).
- Existen plásmidos que alteran el resultado de la pruebas bioquímicas de fermentación de azúcares interfiriendo en los resultados.

La especie *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* aparece en una proporción baja, en ningún caso superior al 2,5%. Estas bacterias son productoras de diacetilo y acetoina, compuestos que influyen notablemente en la formación del aroma en el queso (Colman y col., 1992).

En un trabajo realizado sobre el queso Roncal, se describió *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* como la única especie del género *Lactococcus* (Ordóñez y col., 1980). Esta diferencia con respecto al presente estudio se podría atribuir al hecho de que el número de cepas identificadas en aquel fue menor (80) por lo que la probabilidad de detectar especies minoritarias era menor.

Por otra parte, en 79 cepas de lactococos aisladas de leche, cuajada y quesos acogidos a la D.O. Idiazábal se encontró que la mayor proporción de lactococos (60%) correspondía a la especie *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Esta especie difiere de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en su capacidad para utilizar el citrato, lo que le confiere propiedades diferentes. En el mismo estudio un 30% de las cepas se identificaron como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, mientras que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* estuvo presente únicamente en un 7% de los aislados (Rúa y col., 1993).

En el queso Manchego, 180 de un total de 188 cepas de lactococos aisladas se incluyeron en la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Las 3 restantes se describieron como *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (Martínez-Moreno, 1976). En otro estudio realizado sobre esta variedad de queso por Ordóñez y col (1978a) se encontró *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* como especie minoritaria.

En el queso Gamonedo la mayoría de los lactococos se identificaron como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, detectándose algunas cepas capaces de utilizar el citrato (González de Llano y col., 1992). Similares resultados se observaron en el queso La Serena, aunque varias cepas no se ajustaron a algunas características fisiológicas de la cepa típica (Fernández del Pozo y col., 1988a).

En el queso Torta del Casar, todas las cepas de lactococos se adscribieron a la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Sin embargo, en un porcentaje muy elevado se consideraron atípicas (Pouillet y col., 1993). Es posible que algunas de estas cepas atípicas posean las características fisiológicas de las cepas descritas como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* en el presente trabajo.

En los quesos Serra (Macedo y col., 1993), Cabrales (Núñez, 1978), Los Ibores (Mas y González-Crespo, 1992) y Camembert (Caballero y col., 1986) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se describió como la única especie del género *Lactococcus*. Sin embargo, en el queso Roquefort *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* representó el 24% de los lactococos (Devoyod y Muller, 1969).

3.5.2.- Comparación entre queserías

La distribución de especies en cada una de las 6 queserías estudiadas se muestra en la tabla 38.

Las diferencias entre queserías no son significativas, sin embargo esta conclusión no se puede afirmar con total certeza, ya que los valores obtenidos se encuentran en el límite de significación.

Tabla 38.- Distribución de las especies de lactococos de 4 queserías con D.O. Idiazábal (Q1, Q2, Q3 y Q7) y de 2 con D.O. Roncal (Q4 y Q5).

ESPECIES	QUESERIA						
		Q1	Q2	Q3	Q7	Q4	Q5
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	n	36	34	34	31	37	26
	%	87,8	77,3	81,0	66,0	78,7	61,9
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	n	3	9	8	15	10	15
	%	7,3	20,5	19,0	32	21,3	35,7
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	n	2	1	0	1	0	1
	%	4,9	2,2	0,0	2,0	0,0	2,4

n- número de cepas; %- porcentaje del total de cepas de cada quesería.

Se estudió, en una fase posterior, cada Denominación por separado y tampoco se constataron diferencias significativas en la proporción de especies entre las queserías acogidas a una misma Denominación. Sin embargo, como se ha indicado al considerar todas las queserías en conjunto, los resultados se encuentran en el límite de significación. Cabe señalar, a modo de ejemplo, que en la D.O. Roncal la frecuencia de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en la quesería 4 es superior en un 20% a la quesería 5, mientras que la de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* es un 10% inferior.

Se puede afirmar, que a pesar de ser las diferencias no significativas tanto entre Denominaciones como entre queserías, existe mayor heterogeneidad entre queserías con respecto a la distribución de lactococos.

La especie *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* aparece en muy baja proporción: en 3 queserías supone aproximadamente un 2% del total, en 1 alcanza un 4,9% y en las dos restantes no se ha detectado. Esta especie se caracteriza por su capacidad para producir diacetilo y CO₂ a partir del citrato e influye, de manera

decisiva, en el aroma y en la formación de ojos en el queso. Esta propiedad está codificada por un plásmido (Rocabayera, 1991; Rúa y col., 1993).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* constituyen las dos especies más habituales en los cultivos iniciadores mesófilos empleados en la industria láctea y son las responsables del proceso de acidificación inicial, contribuyendo a la formación del coágulo y la expulsión del suero (Suárez y col., 1983). La disminución de pH, estimula la proliferación de los lactobacilos (Suárez y col., 1984b).

La simbiosis existente entre ambas especies es interesante, ya que poseen distintas propiedades. Así, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* tiene una temperatura mínima de crecimiento de 3 °C y una temperatura máxima de 35 °C, mientras que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sobrevive a temperaturas más altas no desarrollándose por debajo de 10 °C; su velocidad de proliferación es mayor y es capaz de fermentar un número más elevado de carbohidratos (Bengoechea, 1989).

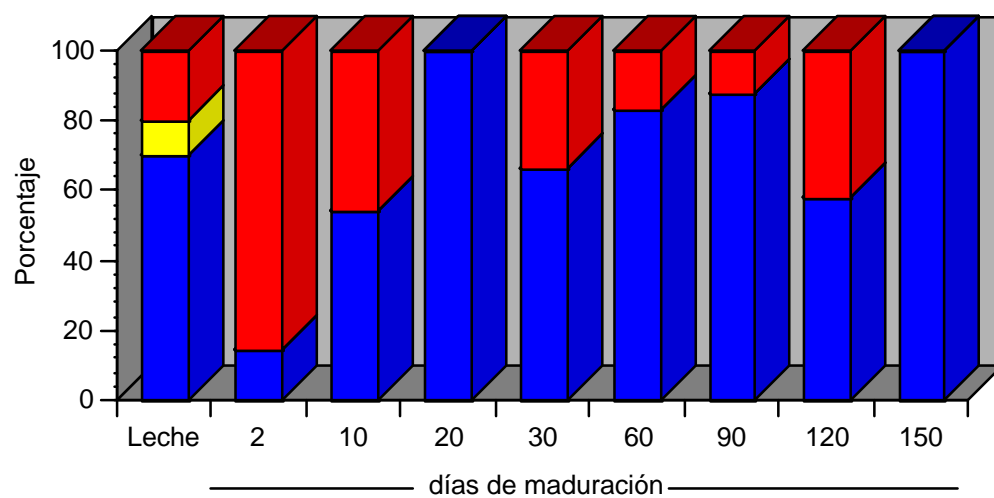
Cabe destacar que la inoculación de la leche con cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* acelera la desaparición de enterobacterias, coliformes y coliformes fecales (Gaya y col., 1986), lo que corrobora la conveniencia de incluirlos en los fermentos como algunos autores han señalado (Ordóñez y col., 1978b; Ramos y col., 1982).

3.5.3.- Comparación entre estadios de maduración

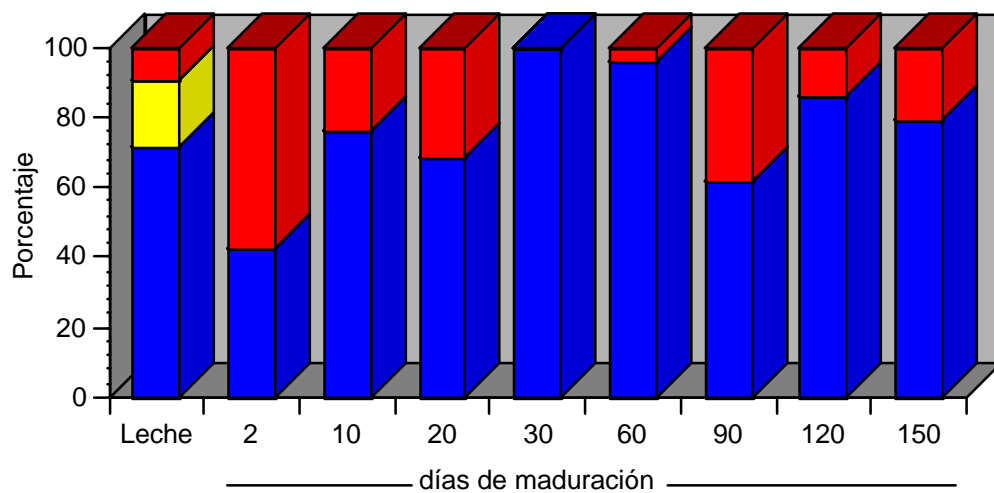
En la figura 21 se representa el porcentaje de especies en función de los días de maduración. Únicamente se han identificado cepas adscritas a la especie *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* en la leche. Esto se puede deber a que no se adicionan en los fermentos y por lo tanto la proporción en la que están presentes disminuye, siendo difícil su detección.

El estudio estadístico se ha realizado con las especies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Se han encontrado diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de las citadas especies a lo largo del tiempo. Es de destacar que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* es la especie predominante en leche y quesos de 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 150 días de maduración, y está presente con respecto a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* en una relación variable y aleatoria en los distintos estadios. Sin embargo, a la salida de salmuera la frecuencia de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* es dos veces superior a la de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Una posible causa de que en otros tipos de quesos similares no se haya encontrado *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* podría ser, además de las anteriormente señaladas, que en aquellos no se aislaron cepas de lactococos de quesos a la salida de salmuera.

RONCAL (89 cepas)



IDIAZABAL (174 cepas)



■ *L. lactis lactis*
■ *L. lactis diacetylactis*
■ *L. lactis cremoris*

Figura 21.- Porcentaje de especies de lactococos aislados de leche y quesos procedentes de 6 queserías: 2 con D.O. Roncal y 4 con D.O. Idiazábal.

3.6.- Identificación de lactobacilos

Se identificaron un total de 494 cepas de lactobacilos de muestras de leche, cuajada y quesos de 1, 2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 150 días de maduración aisladas de placas de agar Rogosa (Difco®).

Todas las cepas fueron descritas como bacilos Gram positivos y catalasa negativos de acuerdo a la clasificación de Sharpe (1979). Posteriormente se identificaron por pruebas fisiológicas siguiendo los criterios de Kandler y Weiss (1986) y Hernández y Dubón (1992d).

La mayoría de las cepas adscritas a una especie se ajustaron a las características fisiológicas de la especie típica. Sin embargo, en varios casos, las cepas difirieron de la cepa tipo en la capacidad para producir ácido a partir de determinados azúcares. La presencia de cepas atípicas es habitual en muchas variedades de quesos y se considera frecuente en cepas salvajes (Pouillet, 1991; Mas y González-Crespo, 1992). Es necesario señalar, que siguiendo el mismo criterio que para otros géneros, se consideró una cepa incluida en una especie si no difería de la cepa tipo en las pruebas de fermentación de más de 2 azúcares (normalmente de 1). Los resultados de las pruebas fisiológicas se detallan en las tablas 39 y 40.

El tipo de metabolismo y las pruebas de crecimiento a temperaturas de 15 y/o 45 °C resultaron determinantes para la clasificación de las cepas.

Dentro del género *Lactobacillus* se describieron cinco especies: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus lactis*.

Todas las cepas adscritas a la especie *Lactobacillus brevis* se diferenciaron por su metabolismo heterofermentativo y por ser capaces de multiplicarse a 15 °C.

Las demás especies poseían metabolismo homofermentativo, distinguiéndose las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus lactis* por la facultad de las primeras de crecer a 15 °C, mientras que las segundas no presentaron crecimiento a dicha temperatura y sí lo hicieron a 45 °C.

Con respecto a la producción de ácido a partir de carbohidratos, cabe señalar que todas las cepas de *Lactobacillus brevis* utilizaron la arabinosa al igual que un 74% de las cepas de *Lactobacillus plantarum*. Un 10% de las cepas de *Lactobacillus acidophilus*, un 1,3% de *Lactobacillus casei* y ninguna cepa de *Lactobacillus lactis* dieron resultados positivos.

La lactosa fue fermentada por todas las cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y únicamente un 5,7% de cepas de *Lactobacillus casei* no la utilizó.

Tabla 39.- Características fisiológicas de las cepas de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* aisladas de leche, cuajada y quesos procedentes de 4 queserías: 2 con D.O. Idiazábal (Q1, y Q2) y 2 con D.O. Roncal (Q4 y Q5).

PRUEBAS	<i>Lactobacillus brevis</i>				<i>Lactobacillus plantarum</i>				<i>Lactobacillus casei</i>			
	Q1	Q2	Q4	Q5	Q1	Q2	Q4	Q5	Q1	Q2	Q4	Q5
nº de cepas	22	11	22	15	53	57	28	46	45	52	68	62
Crecimiento: 15 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación (1)	He	He	He	He	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho
Acido de:												
arabinosa	+	+	+	+	33	42	22	39	2	-	1	-
lactosa					+	+	+	+	41	50	61	+
rafinosa	13	9	8	12	+	+	+	+	-	-	-	-
melibiosa	20	8	21	+	52	+	26	44	6	4	2	2
sacarosa	6	5	7	9	+	+	+	+	+	+	+	+
celobiosa	-	1	-	-	51	+	27	45	40	39	54	60

Los números indican el número de cepas positivas para la prueba.

+ Todas las cepas son positivas para la prueba.

- Todas las cepas son negativas para la prueba.

(1) He.-heterofermentativos; Ho.- homofermentativos

En blanco las pruebas no realizadas

Tabla 40.- Características fisiológicas de las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus lactis* aisladas de leche, cuajada y quesos procedentes de 4 queserías: 2 con D.O. Idiazábal (Q1, y Q2) y 2 con D.O. Roncal (Q4 y Q5).

PRUEBAS	<i>Lactobacillus acidophilus</i>				<i>Lactobacillus lactis</i>			
	Q1	Q2	Q4	Q5	Q1	Q2	Q4	Q5
nº de cepas	3	2	3	2	2	0	0	1
Crecimiento:								
15 °C	-	-	-	-	-			-
45 °C	+	+	+	+	+			+
Fermentación (1)	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho			Ho
Acido de:								
arabinosa	-	-	1	-	-			-
lactosa	+	+	+	+	+			+
rafinosa	1	-	-	-	-			-
sacarosa	+	+	+	+	+			+
salicina	+	+	+	+	+			+
celobiosa	+	+	+	+	-			-

Los números indican el número de cepas positivas para la prueba.

+ Todas las cepas son positivas para la prueba.

- Todas las cepas son negativas para la prueba.

(1) He.-heterofermentativos; Ho.- homofermentativos

Así mismo, todas las cepas de *Lactobacillus plantarum* produjeron ácido de la rafinosa, disminuyendo el porcentaje a un 60% en el caso de *Lactobacillus brevis* y a un 10% en las cepas de *Lactobacillus acidophilus*. La prueba resultó negativa para todas las cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus lactis*. A la vista de los resultados obtenidos para este azúcar, se deduce que la fermentación de la rafinosa constituye una prueba muy útil para diferenciar la especie *Lactobacillus plantarum* de la especie *Lactobacillus casei*.

La melibiosa fue utilizada por la mayoría de las cepas de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum* (91,4 y 97,3% respectivamente) en contraposición con las cepas de *Lactobacillus casei* (6,2%).

Todas las especies fermentaron la sacarosa excepto un 61,4% de las cepas de *Lactobacillus brevis*.

Todas las cepas adscritas a las especies *Lactobacillus lactis* o *Lactobacillus acidophilus* produjeron ácido a partir de la salicina.

La celobiosa pudo ser utilizada por todas las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y la mayoría de las cepas de *Lactobacillus plantarum* (97,8%) y *Lactobacillus casei* (85%). Por el contrario, únicamente un 1,4% de las cepas de *Lactobacillus brevis* y ninguna de *Lactobacillus lactis* dieron resultados positivos.

3.6.1.- Comparación entre Denominaciones

En la figura 22 se representan los porcentajes de las distintas especies de lactobacilos. *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* han sido las especies dominantes, tanto en la D.O. Roncal como en la D.O. Idiazábal. Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas entre ambas Denominaciones en cuanto a la distribución de especies.

Dichas diferencias se deben a la desigual presencia de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*. En la D.O. Idiazábal, el porcentaje de *Lactobacillus plantarum* (44%) es bastante similar al de *Lactobacillus casei* (39%), siendo un poco superior el de *Lactobacillus plantarum*. Por el contrario, en la D.O. Roncal la especie cuantitativamente más importante es *Lactobacillus casei* con un 52,6% del total de cepas aisladas, seguida de *Lactobacillus plantarum* que representa un porcentaje del 30%.

Lactobacillus brevis, con una frecuencia aproximada del 14%, es la tercera especie cuantitativamente más importante. *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus lactis* se encuentran en proporciones bajas y similares en ambas Denominaciones.

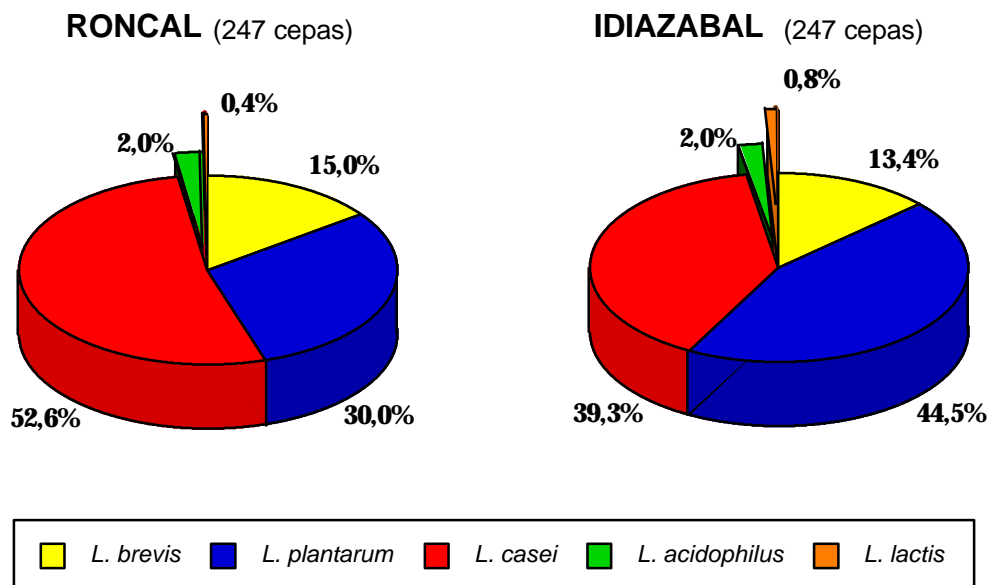


Figura 22.- Porcentaje de especies en 494 cepas de lactobacilos aisladas de leche, cuajada y quesos procedentes de 4 queserías: 2 con D.O. Idiazábal y 2 con D.O. Roncal.

Los resultados de este trabajo, con respecto a la dominancia de la especie *Lactobacillus casei* en el queso D.O. Roncal, concuerdan con los señalados por Ordóñez y col. (1980). Sin embargo, en el mencionado estudio se describieron *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* como las únicas especies de lactobacilos que intervienen en la maduración del queso. Una posible explicación de esta diferencia puede ser que el número de cepas identificadas en este trabajo es muy superior, por lo que es más probable la detección de especies minoritarias.

Por otro lado, en 55 cepas de lactobacilos aisladas de muestras de leche, cuajada y queso de la D.O. Idiazábal se registraron proporciones de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* del 65% y 35 % respectivamente (Rúa y col., 1993). En el presente estudio los porcentajes de ambas especies han resultado ser similares entre sí, siendo incluso un poco más elevado el de *Lactobacillus plantarum*. Además, se han encontrado en baja proporción otras especies homofermentativas: *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus lactis*.

Lactobacillus plantarum y *Lactobacillus casei* son las especies del género *Lactobacillus* cuantitativamente más importantes en muchas variedades de queso:

En el queso Manchego, constituyen prácticamente las únicas especies de lactobacilos, ya que la proporción de *Lactobacillus brevis* (1,7%) es muy baja. Existen, sin embargo, divergencias en la relación entre

ambas especies. Así, mientras Núñez (1976a) detectó una relación 1:1, Ordóñez y col. (1978a) describieron una frecuencia de *Lactobacillus casei* 5 veces superior a la de *Lactobacillus plantarum*.

En el queso La Serena, las especies dominantes son también *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* (Fernández del Pozo y col., 1988a) al igual que en el queso Serra (Macedo y col., 1993).

En el queso Gamonedo, la especie más frecuente es *Lactobacillus plantarum*, seguida de *Lactobacillus casei*. *Lactobacillus brevis* aparece en baja proporción.

En el queso Torta del Casar, se han detectado, en 163 cepas, hasta 10 especies de lactobacilos distintas. Las más importantes numéricamente son *Lactobacillus curvatus* (29,4%) y *Lactobacillus plantarum* (28,2%) seguidas de *Lactobacillus brevis* (Poulet y col., 1993). La especie *Lactobacillus curvatus* ha sido también descrita en un 15% de los aislados en el queso Cheddar. En este tipo de queso el 57% de los lactobacilos fueron identificados como *Lactobacillus casei* (Jordan y Cogan, 1993).

En el queso Feta, la especie mayoritaria es *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus casei*, con apenas un 0,5% del total, se encuentra como especie minoritaria. (Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki, 1992).

En las variedades de queso Cabrales (Núñez, 1978), Mahón (Suárez y col., 1983, 1984a) y Los Ibores (Mas y González-Crespo, 1992) la especie predominante es *Lactobacillus plantarum*, con una frecuencia superior en 2 o 3 veces a la de *Lactobacillus casei*.

En los quesos italianos elaborados en el Valle Camonica, únicamente se ha descrito la especie *Lactobacillus casei* (Garbelli y col., 1984).

Lactobacillus casei y *Lactobacillus plantarum* son dos especies similares en cuanto a su poder acidificante. En general, se cree que *Lactobacillus casei* se instala en el queso más fácilmente que *Lactobacillus plantarum*, sin embargo si esta última especie está presente en la leche, normalmente persiste en el queso hasta estadios avanzados de maduración (Suárez y col., 1983).

Existen distintas opiniones en cuanto a la vía de entrada de los lactobacilos. En quesos elaborados con leche cruda se cree que tienen su origen en la misma leche y que posteriormente proliferan con facilidad (Ordóñez y col., 1980). En quesos elaborados con leche pasteurizada se consideran flora "contaminante o adventicia", que llega a la leche durante el proceso de elaboración del queso, excepto en el caso de que se adicionen en los fermentos (Jordan y Cogan, 1993; Martley y Crow, 1993).

3.6.2.- Comparación entre queserías

La distribución de las especies en cada quesería se muestra en la tabla 41.

Se han encontrado diferencias significativas entre queserías debidas principalmente a las detectadas entre Denominaciones, ya señaladas en el apartado 3.6.1.

Tabla 41.- Distribución de las especies de lactobacilos aisladas de leche, cuajada y quesos de 4 queserías: 2 con D.O. Idiazábal (Q1 y Q2) y 2 con D.O. Roncal (Q4 y Q5).

ESPECIES	QUESERIA				
		Q1	Q2	Q4	Q5
<i>Lactobacillus brevis</i>	n	22	11	22	15
	%	17,6	9	18,2	11,9
<i>Lactobacillus plantarum</i>	n	53	57	28	46
	%	42,4	46,7	23,1	36,5
<i>Lactobacillus casei</i>	n	45	52	68	62
	%	36	42,6	56,2	49,2
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	n	3	2	3	2
	%	2,4	1,6	2,5	1,6
<i>Lactobacillus lactis</i>	n	2	0	0	1
	%	1,6	0	0	0,8

n- número de cepas; %- porcentaje del total de cepas de cada quesería.

Al estudiar cada Denominación por separado se ha constatado que no hay diferencias significativas entre las dos queserías adscritas a la D.O. Idiazábal, a pesar de ser algo superior la proporción de *Lactobacillus brevis* en la quesería 1. Las 2 queserías de la D.O. Roncal muestran diferencias entre ellas, aunque tampoco llega a haber significación a un nivel de confianza del 95%.

Se puede por lo tanto afirmar, que las diferencias entre ambas Denominaciones en cuanto a la distribución de las especies de lactobacilos, son mayores que las encontradas dentro de cada Denominación, existiendo mayor homogeneidad entre las queserías de la D.O. Idiazábal que en las acogidas a la D.O. Roncal.

En este estudio no se ha observado ninguna relación entre el pH de los quesos y la predominancia de alguna especie, al contrario de lo señalado por Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki (1992). Dichos autores sugirieron que un pH bajo (4,56) favorece el desarrollo de *Lactobacillus plantarum*, mientras que en este estudio se ha constatado que la quesería 4, cuyos quesos poseen pH más bajo a lo largo de la maduración (5,1-

5,3), presenta el menor porcentaje de *Lactobacillus plantarum* mientras que las que poseen un pH intermedio (1 y 2) tienen las proporciones más elevadas de dicha especie.

Es lógico pensar, que tanto *Lactobacillus casei*, como *Lactobacillus plantarum*, influyen en gran medida en las características organolépticas del queso a través de sus actividades proteolíticas y lipolíticas, como han indicado algunos autores (Suárez, 1984b). De hecho, se han realizado experiencias en plantas piloto adicionando distintas cepas de *Lactobacillus casei* y se ha obtenido un incremento considerable de la intensidad del sabor en el queso Cheddar (Trépanier y col., 1991, 1992). Por otra parte, la facultad de la mayor parte de las cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* de producir diacetilo, proporciona al queso un aroma característico (Núñez, 1976a; Rocabayera, 1991), aunque algunos autores consideran que la única especie con capacidad para producir diacetilo es *Lactobacillus plantarum* (Caballero y col., 1986).

Así mismo, es posible que la presencia de *Lactobacillus plantarum* acelere la desaparición de enterobacterias y coliformes por su habilidad para generar peróxido de oxígeno y bacteriocinas, como han señalado Gaya y col. (1986) y Rocabayera (1991).

Lactobacillus brevis se ha descrito en este trabajo como la tercera especie en todas las queserías, en cuanto a porcentaje se refiere. Se sugiere que se debe a que su ritmo de proliferación es menor, como consecuencia de que el equilibrio de aminoácidos y el incremento de la presión osmótica ejercen un efecto inhibitorio (Ordóñez y col., 1978). Debido a su metabolismo heterofermentativo, cabe pensar que *Lactobacillus brevis* es una de las bacterias que puede contribuir a la formación de ojos en el queso.

Lactobacillus acidophilus, representa menos del 2,5% del total de lactobacilos identificados en cada una de las queserías. Se ha detectado, también en baja proporción, en los quesos Torta del Casar (Poulet y col., 1993), Serra (Macedo y col., 1993) y en algunos quesos italianos (Clementi y col. 1994). Esta especie normalmente forma parte de la flora intestinal y actúa previniendo el crecimiento de microorganismos perjudiciales.

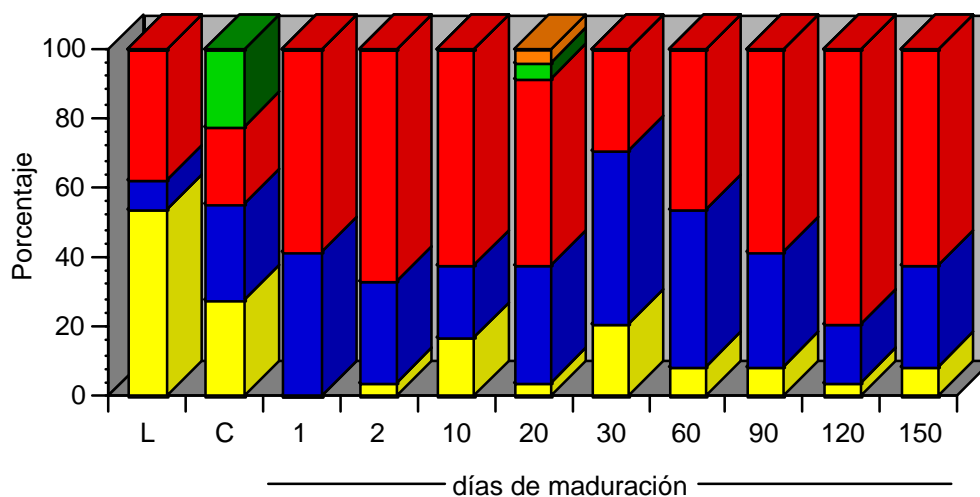
3.6.3.- Comparación entre estadios de maduración

La distribución de las especies en función de los días de maduración, parece ser bastante aleatoria, sin embargo el hecho de que el número de cepas adscritas a cada especie en cada estadio de maduración sea bajo no permite establecer conclusiones con rigor estadístico (figura 23).

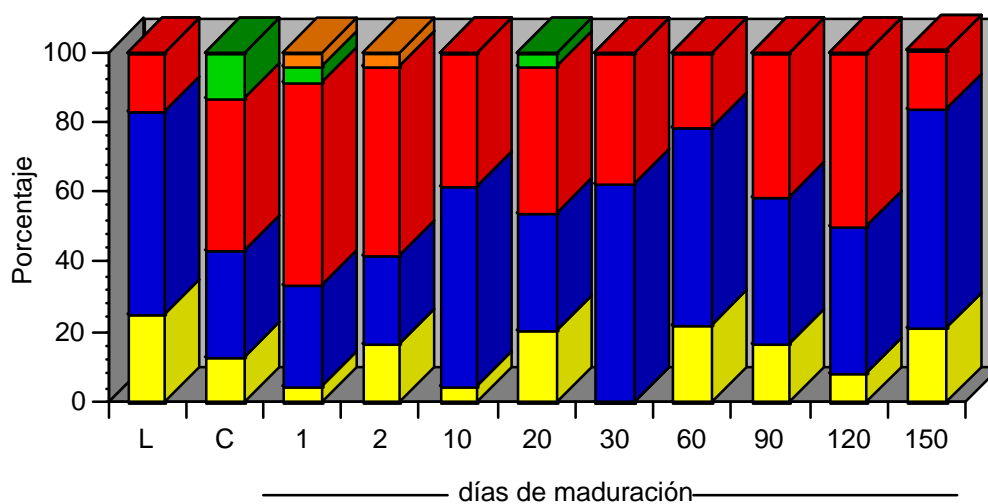
Sí parece importante destacar que las distintas especies aparecen a lo largo de toda la maduración, sin que se halla observado que alguna desaparece a partir de una fase determinada.

Por otra parte, cabe señalar que *Lactobacillus acidophilus* se ha identificado fundamentalmente en la cuajada. Esto puede ser debido, tanto a que las condiciones de pH y concentración de ClNa en el medio son inhibitorias y no permiten su proliferación, como a que su velocidad de multiplicación es baja, permitiendo el desarrollo de otras especies. Esta segunda posibilidad ha sido mencionada por algunos autores (Srinivas y col., 1990).

RONCAL (247 cepas)



IDIAZABAL (247 cepas)



■ *L. brevis*
■ *L. plantarum*
■ *L. casei*
■ *L. acidophilus*
■ *L. lactis*

Figura 23.- Porcentaje de especies de lactobacilos aislados de leche (L), cuajada (C) y quesos de 4 queserías: 2 con D.O. Roncal y 2 con D.O. Idiazábal.

3.7.- Identificación de leuconostoc

Se identificaron 464 cepas de leuconostoc de muestras de leche, cuajada y quesos de 1, 2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 150 días de maduración aisladas de agar MSE de Bioser[®].

Todas las cepas se describieron como cocos Gram positivos, con una disposición en pares y raramente en cadenas, catalasa negativos y de metabolismo heterofermentativo, por lo que se incluyeron en el género *Leuconostoc*.

De las 845 colonias aisladas en un principio, un 45,1% no se identificaron como especies de *Leuconostoc*. Este alto porcentaje indica la baja selectividad del medio de cultivo empleado, considerado específico, para el aislamiento de este género de bacterias.

Las 464 cepas adscritas al género *Leuconostoc* se identificaron a nivel de especie según los criterios de Garvie (1986) y Fernández y Dubón (1992c). Hay que señalar, como se ha indicado en los apartados correspondientes a identificaciones de otros géneros microbianos, que no todas las cepas adscritas a una especie cumplieron las características fisiológicas de la cepa típica. La presencia de un elevado número de cepas de leuconostoc con patrones de fermentación de carbohidratos distintos a los de la cepa tipo ha sido indicada por varios autores (Ordóñez y col., 1978a; Garvie, 1984; Milliere y col., 1989). El criterio adoptado para incluir una cepa en una especie fue no diferir en más de dos pruebas (normalmente de una) con respecto a la cepa tipo. Así mismo, se han considerado definitivas las pruebas que mostraron resultados coincidentes en la bibliografía utilizada.

Dentro del género *Leuconostoc* se han descrito cuatro especies: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc paramesenteroides*.

Todas las especies de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* formaron dextranos a partir de la sacarosa, dando lugar a unas colonias mucilaginosas muy características. Las colonias de *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc paramesenteroides* no presentaban dicha morfología.

Todas las cepas de *Leuconostoc lactis* crecieron a una temperatura de 37 °C, después de someterlas a 55 °C durante 15 minutos.

Con respecto a la producción de ácido a partir de distintos azúcares cabe señalar que todas las cepas de *Leuconostoc lactis* utilizaron la sacarosa al igual que un 95% de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, un 95,7% de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y un 94,1% de *Leuconostoc paramesenteroides*.

Tabla 42.- Características fisiológicas de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* aisladas de leche, cuajada y quesos de 6 queserías: 3 con D.O. Idiazábal (Q1, Q2 y Q3) y 3 con D.O. Roncal (Q4, Q5 y Q6).

PRUEBAS	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>						<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
nº de cepas	23	66	5	31	21	14	36	40	16	56	82	46
Colonias dextrosas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación (1)	He	He	He	He	He	He	He	He	He	He	He	He
Producción de diacetilo	2	5	-	6	-	1	5	4	-	6	8	1
Acido de:												
sacarosa	22	64	+	30	17	+	+	34	15	+	79	44
arabinosa	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
trealosa	+	61	4	30	+	+	34	37	+	54	79	+
fructosa	22	62	+	+	19	13	35	37	+	+	76	45
melibiosa	11	26	2	12	13	6	31	37	14	+	79	40

Los números indican el número de cepas positivas para la prueba.

(1) He.- heterofermentativos; Ho.- homofermentativos.

+ Todas las cepas son positivas para la prueba.

- Todas las cepas son negativas para la prueba.

Tabla 43.- Características fisiológicas de las cepas de *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc paramesenteroides* aisladas de leche, cuajada y quesos de 6 queserías: 3 con D.O. Idiazábal (Q1, Q2 y Q3) y 3 con D.O. Roncal (Q4, Q5 y Q6).

PRUEBAS	<i>Leuconostoc lactis</i>						<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
nº de cepas	2	4	0	2	3	0	6	8	0	1	2	0
Colonias dextrosas	-	-		-	-		-	-		-	-	
Fermentación (1)	He	He		He	He		He	He		He	He	
Resistencia al calentamiento (55 °C-15 minutos) y crecimiento a 37 °C	+	+		+	+		5	7		+	+	
Producción de diacetilo	-	-		-	1		1	-		-	-	
Acido de:												
sacarosa	+	+		+	+		+	7		+	+	
arabinosa	-	1		-	-		2	5		-	1	
trealosa	-	-		-	-		+	+		+	+	
fructosa	+	3		+	+		5	5		+	-	
melibiosa	-	1		1	-		5	6		-	+	

Los números indican el número de cepas positivas para la prueba.

(1) He.- heterofermentativos; Ho.- homofermentativos.

+ Todas las cepas son positivas para la prueba.

- Todas las cepas son negativas para la prueba.

La arabinosa fue un azúcar fermentado por todas las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. El porcentaje disminuyó a un 47,1% en el caso de *Leuconostoc paramesenteroides* y a un 9% en las cepas de *Leuconostoc lactis*. La prueba resultó negativa para las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Los resultados obtenidos de la fermentación de este azúcar son determinantes para diferenciar *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

La trealosa dió resultados positivos en todas las cepas de *Leuconostoc paramesenteroides* y en la mayoría de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (95,6%) y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (96,4%). Por el contrario, ninguna cepa de *Leuconostoc lactis* fermentó dicho carbohidrato.

Un 96% de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* produjeron ácido de la fructosa. Este carbohidrato también fue utilizado por la mayoría de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (95%), *Leuconostoc lactis* (91%) y *Leuconostoc paramesenteroides* (64,7%).

Una alta proporción de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Leuconostoc paramesenteroides* produjeron ácido a partir de la melibiosa (93,1 y 76,5% respectivamente). Así mismo, un 43,8% de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y un 18,2% de las de *Leuconostoc lactis* dieron resultados positivos.

Por último, cabe destacar que del total de cepas identificadas, únicamente el 8,6% fueron productoras de diacetilo a partir de citrato. Este hecho, descrito por otros autores (Núñez, 1976b; Caballero y col., 1986; Poulet, 1991; Mas y González, 1992) contrasta con el papel productor de aroma que se atribuye a los leuconostoc por su capacidad de producir diacetilo. Se cree que los leuconostoc son inertes en leche y solamente en asociación con lactococos, y a veces con otras bacterias lácticas, fermentan el citrato y producen diacetilo (Vedamuthu, 1994). Esto explicaría, como señaló Rocabayera (1991), que las cepas puras mantenidas en el laboratorio no sean capaces de metabolizar el citrato.

3.7.1.- Comparación entre Denominaciones

En la figura 24 se muestra la distribución de las especies de leuconostoc en las dos Denominaciones estudiadas. Entre ambas Denominaciones se han encontrado diferencias significativas respecto a la frecuencia de especies, debidas principalmente a la proporción entre las dos especies mayoritarias. Así, mientras en la D.O. Roncal la relación entre *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* es aproximadamente 3:1, en la D.O. Idiazábal las dos especies están presentes en porcentajes similares.

Es de destacar que en las dos Denominaciones únicamente aparecen, además de las citadas anteriormente, dos especies minoritarias: *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc paramesenteroides*. Tanto en la D.O. Roncal como en la D.O. Idiazábal, la suma de ambas especies supone menos del 10% del total.

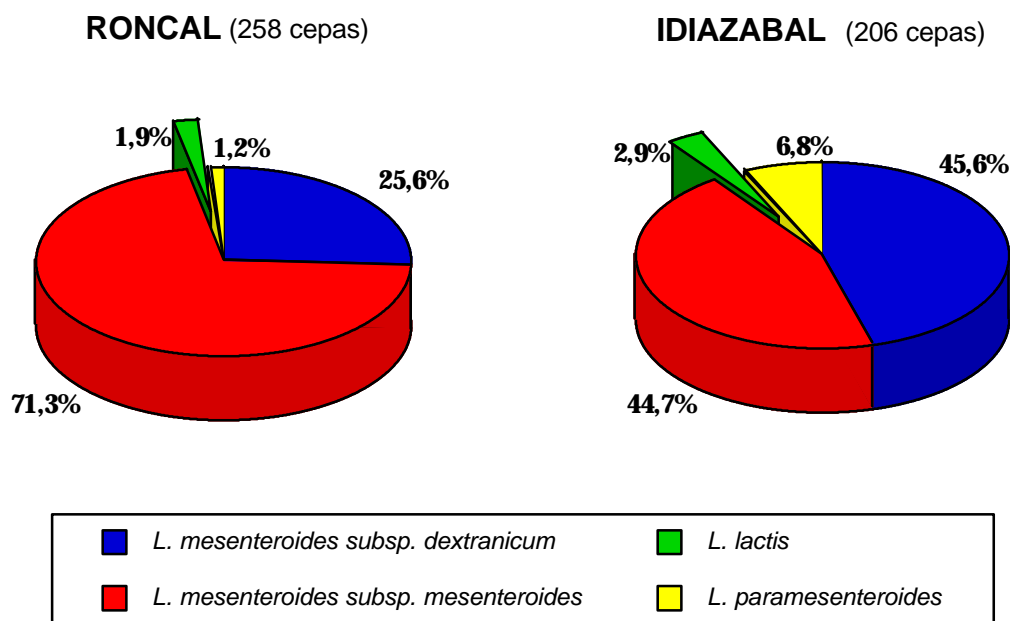


Figura 24.- Porcentaje de especies en 464 cepas de leuconostoc aisladas de leche, cuajada y quesos procedentes de 6 queserías: 3 con D.O. Roncal y 3 con D.O. Idiazábal.

Los resultados obtenidos en este estudio difieren de los encontrados por otros autores. Así, en el queso con D.O. Roncal, Ordóñez y col. (1980) identificaron 30 cepas de leuconostoc. De éstas, 10 se incluyeron en la especie *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* y 20 en la especie *Leuconostoc lactis*. Por otra parte, la única especie encontrada en 15 cepas de leuconostoc identificadas por Rúa y col. (1993), en el queso D.O. Idiazábal fue *Leuconostoc lactis*.

Estas diferencias son importantes, ya que la presencia de una u otra especie modifica las características del queso. Tanto *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* como *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* son especies productoras de dextrano, mientras que *Leuconostoc lactis* no posee dicha propiedad. Se ha sugerido que los dextranos producen un aumento de viscosidad. Sin embargo, su posible influencia en la textura del queso no se conoce bien, ya que únicamente se ha utilizado como estabilizante en leche reconstituida con sacarosa o en alimentos que contienen dicho azúcar (Vedamuthu, 1994). Por otra parte, se ha constatado que este mucopolisacárido posee propiedades antimicrobianas inhibiendo el desarrollo de enterobacterias y coliformes.

Una posible causa de la variación en la distribución de especies en los distintos trabajos podría ser la baja selectividad del medio de aislamiento, que puede dar lugar a errores al incluir cepas en el género *Leuconostoc* sin examinarlas detalladamente. Otra de las razones de esta divergencia en las identificaciones

puede ser el elevado número de cepas atípicas que aparecen lo que provoca confusión al clasificarlas a nivel de especie.

Todas las consideraciones anteriores junto a una posible distribución de especies del género *Leuconostoc* específica de cada tipo de queso pueden explicar la gran heterogeneidad entre los resultados descritos en la bibliografía para quesos similares a los del presente trabajo, e incluso diferencias importantes en estudios realizados sobre un mismo tipo de queso.

Núñez (1976b) encontró en el queso Manchego las especies *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Sin embargo, Ordóñez y col., (1978a) caracterizaron 20 de 24 especies como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y las 4 restantes como *Leuconostoc lactis*, mientras que Ramos y col. (1981) señalaron que la única especie de *leuconostoc* que participa en la maduración del queso Manchego es *Leuconostoc lactis*.

En el queso Torta del Casar, el 36,9% de 314 cepas de *leuconostoc* aisladas se incluyeron en la especie *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y el 34,3% y 23,6% se identificaron como *Leuconostoc paramesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* respectivamente. *Leuconostoc lactis*, con un 2,2% del total resultó ser una especie minoritaria (Poulet y col., 1993).

En el queso La Serena la especie predominante es *Leuconostoc mesenteroides* (Fernández del Pozo y col., 1988a) mientras en el queso Teleme *Leuconostoc paramesenteroides* es la especie cuantitativamente más importante (Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki, 1992).

3.7.2.- Comparación entre queserías

En la tabla 44 se indican los porcentajes de las diferentes especies descritas de *leuconostoc* en las 6 queserías estudiadas. Como se puede observar, el número de cepas adscritas a las especies *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc paramesenteroides* es muy pequeño. Es preciso, por ello, prescindir de estas especies para poder obtener resultados concluyentes al comparar estadísticamente las distintas queserías.

Tabla 44.- Distribución de las especies de *leuconostoc* aisladas de leche, cuajada y quesos de 6 queserías: 3 con D.O. Idiazábal (Q1, Q2 y Q3) y 3 con D.O. Roncal (Q4, Q5 y Q6).

ESPECIE	QUESERIA						
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
<i>Leuconostoc</i>	n	23	66	5	31	21	14

<i>mesenteroides</i> <i>subsp. dextranicum</i>	%	34,3	55,9	23,8	34,4	19,4	23,3
<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>	n	36	40	16	56	82	46
<i>subsp. mesenteroides</i>	%	53,7	33,9	76,2	62,2	75,9	76,7
<i>Leuconostoc</i> <i>lactis</i>	n	2	4	0	2	3	0
	%	3,0	3,4	0,0	2,2	2,8	0,0
<i>Leuconostoc</i> <i>paramesenteroides</i>	n	6	8	0	1	2	0
	%	9,0	6,8	0,0	1,1	1,9	0,0

n- número de cepas; %- porcentaje del total de cepas de cada quesería.

Se han encontrado diferencias significativas en la distribución de las especies *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* entre las queserías.

Es de destacar, que no existe homogeneidad entre las queserías acogidas a una misma Denominación, observándose diferencias significativas tanto dentro de la D.O. Roncal como en la D.O. Idiazábal. Se puede indicar, a modo de ejemplo, cómo la quesería 3 es mucho más parecida a la 6 que la 1 o 2, a pesar de estar acogida a la misma Denominación que éstas dos últimas. Este hecho permite señalar que las diferencias entre Denominaciones descritas en el apartado 3.7.1. se deben en gran parte a la heterogeneidad detectada entre queserías. Por ello, se considera que el estudio individualizado de cada quesería aporta, de cara a trabajos posteriores, mayor información que el de las Denominaciones.

Las especies *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* poseen propiedades similares por lo que podrían posiblemente contribuir de forma parecida en la maduración del queso. Ambas especies constituyen más del 87% del total de leuconostoc en cada una de las seis queserías estudiadas. Estas especies en asociación con los lactococos contribuyen a la formación del aroma mediante la producción de diacetilo, ácido acético y etanol. Sin embargo, en algunos casos se les ha asociado con defectos en el sabor (Milliere y col., 1989).

Cabe señalar que es posible que el CO₂ generado a través de su metabolismo intervenga en la formación de pequeños ojos en la pasta como han señalado algunos autores (Ordóñez y col., 1980; Bengoechea, 1989; Rocabayera, 1991; Narvhus y col., 1993), aunque este hecho viene condicionado fuertemente por el tipo de prensado. Por otro lado, El CO₂ actúa inhibiendo el crecimiento de mohos contaminantes sensibles a dicho gas (Vedamuthu, 1994).

A pesar de que su papel no está totalmente dilucidado, son varios los trabajos en los que se propone la inclusión de los *Leuconostoc* en el cultivo iniciador para contribuir de forma favorable a las características organolépticas del queso (Gaya y col., 1986; Martley y Crow, 1993; Massa y col., 1994).

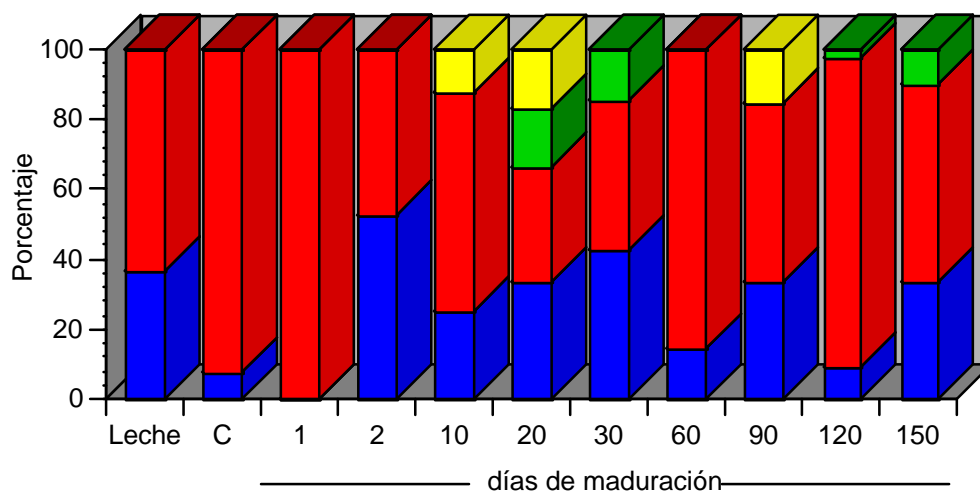
3.7.3.- Comparación entre estadios de maduración

En la figura 25 se representa la distribución de las especies de *Leuconostoc* a lo largo del tiempo en las dos Denominaciones. Los porcentajes varían de forma aleatoria. No es posible obtener conclusiones con rigor estadístico ya que el número de cepas adscritas a cada especie en cada fase de maduración es insuficiente. El hecho de que tanto *Leuconostoc lactis* como *Leuconostoc paramesenteroides* aparezcan únicamente en determinados estadios de maduración no parece tener ninguna causa justificada. Posiblemente son aisladas de forma casual, al encontrarse en una proporción tan baja.

Cabe señalar que no se ha observado que ninguna especie sea típica de una fase determinada, ni que desaparezca a lo largo de la maduración.

Así mismo, hay que indicar que la presencia de la especie *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* es superior y la de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* inferior en los quesos acogidos a la D.O. Idiazábal que en los adscritos a la D.O. Roncal en casi todos los estadios de maduración. Aunque es necesario tener en cuenta la heterogeneidad entre las queserías acogidas a una misma Denominación, señaladas en el apartado 3.7.2.

RONCAL (258 cepas)



IDIAZABAL (206 cepas)

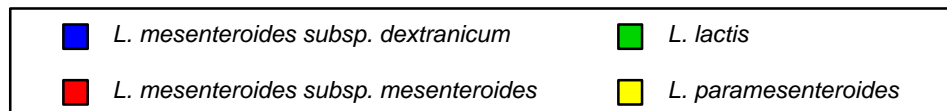
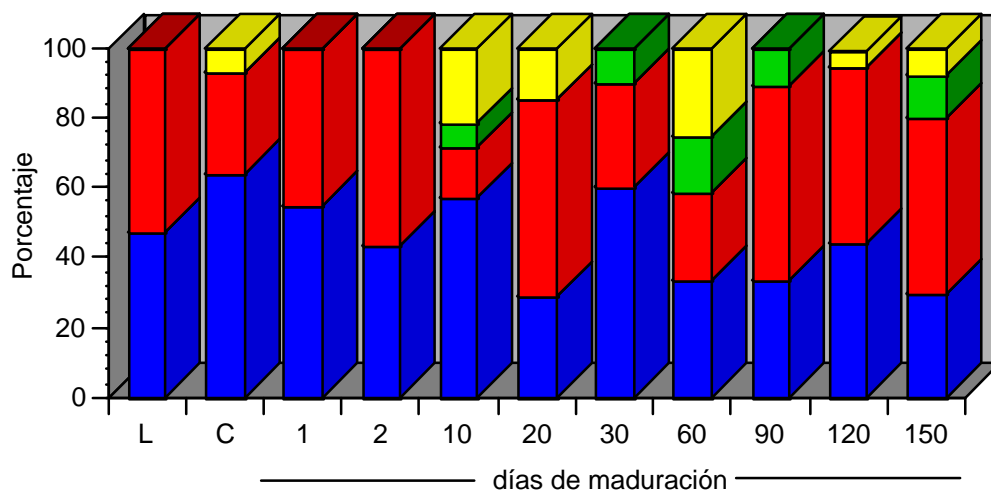


Figura 25.- Porcentaje de especies de leuconostoc aisladas de leche (L), cuajada (C) y quesos procedentes de 6 queserías: 3 con D.O. Roncal y 3 con D.O. Idiazábal.

3.7.4.- Comparación entre la leche y los quesos de 4 meses

Es posible comparar la frecuencia de las especies *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* en la leche y en los quesos de 4 meses ya que el número de cepas aisladas en ambos estadios es muy superior.

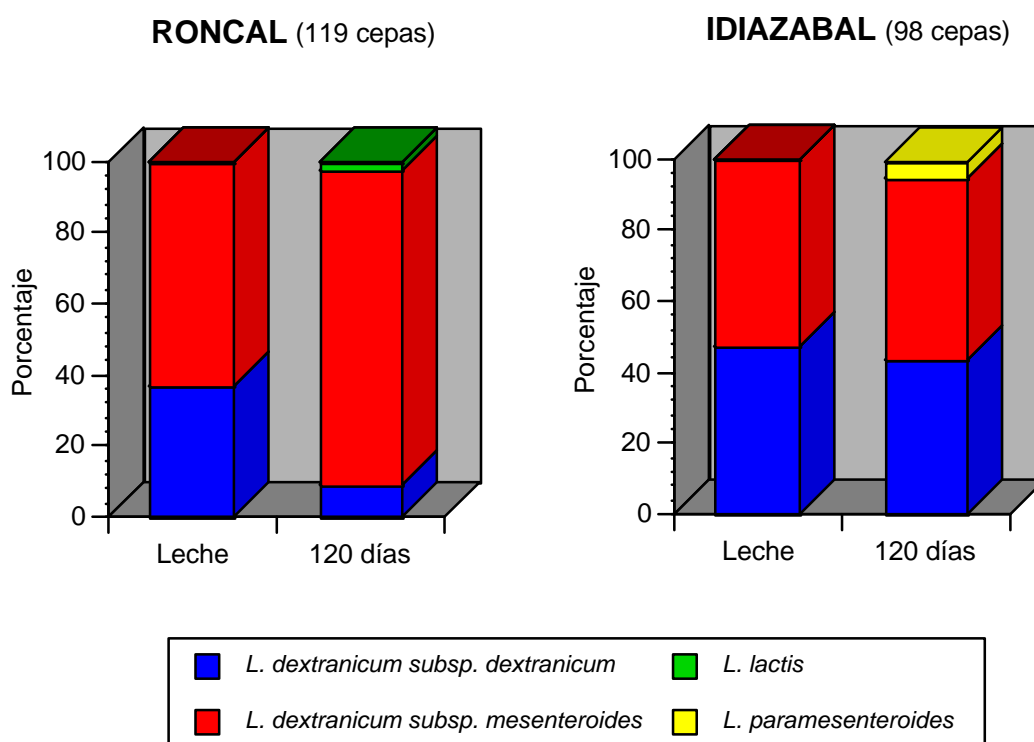


Figura 26.- Porcentaje de especies en 217 cepas de leuconostoc aisladas de leche y quesos de 4 meses procedentes de 6 queserías: 3 con D.O. Roncal y 3 con D.O. Idiazábal.

En la D.O. Roncal se han encontrado diferencias significativas. Estas se deben a que en la leche la relación *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Leuconostoc dextranicum* subsp. *dextranicum* es de 3:1, mientras que en los quesos de 4 meses es de 6:1. Por lo tanto, se produce un aumento del porcentaje de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* a lo largo de la maduración.

En la D.O. Idiazábal las diferencias en la proporción de las especies en leche y quesos de 4 meses son no significativas, ya que la relación entre las dos especies mayoritarias se mantiene bastante constante en 1:1.

Al considerar estos estudios es necesario tener en cuenta que existen diferencias entre las queserías acogidas a cada Denominación (apartado 3.7.2.).

Por otra parte, cabe señalar que las especies *Leuconostoc lactis* y *Leuconostoc paramesenteroides* no se han descrito en leche. Las posibles causas son dos:

- No existen estas especies en la leche.
- Ambas especies están presentes en la leche en porcentajes muy bajos .

Esta segunda razón parece ser la más probable ya que se han encontrado en quesos como especies cuantitativamente poco importantes. El hecho de que no se detecten en la leche y sí en queso puede ser debido a que el número de cepas aisladas en estos últimos es más elevado, siendo mayor la probabilidad de aislar especies minoritarias.

3.8.- Identificación de enterococos

Se identificaron 282 cepas de enterococos de muestras de leche y quesos de 120 días, aisladas de placas de agar Kf Streptococcus (Difco®).

Todas las cepas se describieron como cocos Gram positivos, catalasa negativos y de metabolismo homofermentativo, según la clasificación de Sharpe (1979). 280 cepas (99,3%) crecieron con una concentración de ClNa en el medio del 6,5% y 259 (91,8%) a una temperatura de 45 °C. Así mismo, 269 cepas (95,4%) presentaron resultados positivos en la prueba de reducción del azul de metileno al 0,1%.

Las 282 cepas se ubicaron dentro del género *Enterococcus* de acuerdo a la nueva clasificación de Schleifer (1987) y Schleifer y Kilpper-Bälz (1984). Posteriormente se identificaron según los criterios de Orvin (1986a) y Hernández y Dubón (1992a).

Es necesario señalar, que la mayoría de las cepas adscritas a una especie no se ajustaron exactamente a la cepa considerada típica para dicha especie. El predominio de cepas de enterococos atípicas ha sido constatado por muchos autores en otros tipos de quesos (Carrasco y col., 1979; Batish y Ranganathan, 1984; Poulet, 1991; Mas y González-Crespo, 1992; Poulet y col., 1993).

El criterio adoptado en el presente trabajo para incluir una cepa en una especie ha sido que no difiriese en más de 2 pruebas con respecto a la cepa tipo. Por otra parte, se ha dado mayor relevancia a las pruebas que mostraron resultados coincidentes en toda la bibliografía utilizada, ya que, se han observado contradicciones entre los distintos autores con respecto a algunas pruebas bioquímicas que caracterizan a las especies.

Las especies encontradas fueron cuatro: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus avium*.

Los resultados detallados de las pruebas fisiológicas obtenidos para cada especie se muestran en las tablas 45 y 46.

Todas las cepas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus durans* redujeron el azul de metileno al 0,1%, mientras que las 13 cepas consideradas *Enterococcus avium* no lo hicieron.

Ninguna cepa de *Enterococcus faecium* ni de *Enterococcus durans* creció en presencia de telurito potásico al 0,04%, mientras que prácticamente todas las cepas de *Enterococcus faecalis* (98,8%) lo hicieron. Las cepas de *Enterococcus avium* dieron resultado positivo en un 23,1% de los casos.

Con respecto a la capacidad para utilizar el piruvato como fuente de energía, cabe señalar que un 95% de las cepas de *Enterococcus faecalis* lo utilizaron. El porcentaje disminuyó a un 22,2% en el caso de *Enterococcus durans* y a un 11,1% para las especies de *Enterococcus faecium*. Ninguna de las cepas de *Enterococcus avium* mostró resultados positivos.

Con relación al número de cepas capaces de producir ácido de los distintos azúcares ensayados hay que señalar que la inulina no fue utilizada por ninguna cepa de *Enterococcus faecium* ni de *Enterococcus durans* y sólo lo hicieron un 7,7% de las cepas de *Enterococcus avium* y un 8,3% de las de *Enterococcus faecalis*.

Ninguna cepa de *Enterococcus durans* fermentó la arabinosa y sí la fermentaron todas las de *Enterococcus avium*, un 72,2% de las de *Enterococcus faecium* y un 14% de las cepas de *Enterococcus faecalis*.

Ninguna cepa de *Enterococcus durans* produjo ácido de la melibiosa, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus avium* dieron resultados positivos en un 32,6%, un 83,3% y un 76,9% de las cepas respectivamente.

El manitol fue utilizado por la mayoría de las cepas: un 90,1% de las cepas de *Enterococcus faecalis*, un 83,3% de las adscritas a *Enterococcus faecium* y un 92,3% de las de *Enterococcus avium*.

Un 91,7% de las cepas de *Enterococcus faecalis* y un 76,9% de las cepas de *Enterococcus avium* fermentaron la melicitosa, siendo una minoría las cepas pertenecientes a las especies de *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecium* (11,1 y 5,6% respectivamente) capaces de fermentar dicho azúcar.

Tabla 45.- Características fisiológicas de las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* aisladas de leche, y quesos de 4 meses procedentes de 6 queserías: 3 con D.O. Idiazábal (Q1, Q2 y Q3) y 3 con D.O. Roncal (Q4, Q5 y Q6).

PRUEBAS	<i>Enterococcus faecalis</i>						<i>Enterococcus faecium</i>					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
nº de cepas	40	30	50	35	49	38	3	5	2	3	0	5
Crecimiento:												
45 °C	37	26	49	32	46	+	2	4	+	2		+

CINa 6,5%	+	+	+	34	+	+	+	4	+	+	+
Reducción de: azul de metileno 0,1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Resistencia al telurito potásico 0,04%	+	+	49	33	+	+	-	-	-	-	-
Utilización del piruvato	36	28	49	33	47	37	1	1	-	-	-
Acido de:											
inulina	4	2	4	4	3	3	-	-	-	-	-
arabinosa	6	3	8	4	7	6	+	4	+	2	2
melibiosa	6	4	14	21	22	12	+	4	1	+	4
manitol	34	27	42	31	48	36	2	4	+	2	+
melicitosa	36	27	46	34	43	36	-	-	-	1	-

Los números indican el número de cepas positivas para la prueba.

+ Todas las cepas son positivas para la prueba.

- Todas las cepas son negativas para la prueba.

Tabla 46.- Características fisiológicas de las cepas de *Enterococcus durans* y *Enterococcus avium* aisladas de leche, y quesos 4 meses procedentes de 6 queserías: 3 con D.O. Idiazábal (Q1, Q2 y Q3) y 3 con D.O. Roncal (Q4, Q5 y Q6).

PRUEBAS	<i>Enterococcus durans</i>						<i>Enterococcus avium</i>					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
n° de cepas	0	3	0	0	1	5	3	4	0	4	1	1
Crecimiento:												
45 °C		1			+	+	1	3		3	+	+
CINa 6,5%		+			+	5	+	+		+	+	+
Reducción de:												
azul de metileno		+			+	+	-	-		-	-	-
0,1%												
Resistencia al												
Telurito potásico		-			-	-	1	-		2	-	-
0,04%												
Utilización del piruvato		2			-	-	-	-		-	-	-
Acido de:												
inulina		-			-	-	-	-		1	-	-
arabinosa		-			-	-	+	+		+	+	+
melibiosa		-			-	-	1	+		+	+	-
manitol							+	+		3	+	+
melicitosa		-			-	1	+	2		3	+	+

Los números indican el número de cepas positivas para la prueba.

+ Todas las cepas son positivas para la prueba.

- Todas las cepas son negativas para la prueba.

Como se puede observar, se obtuvieron variaciones de las pruebas de fermentación en cepas adscritas a una misma especie. No se ha encontrado que la fermentación de alguno de los azúcares probados muestre mayor sensibilidad para diferenciar enterococos, a pesar de que algunos autores han sugerido que la fermentación de la arabinosa y el manitol es más útil que la de la melicitosa, melibiosa e inulina por dar éstos últimos mayores oscilaciones entre las cepas adscritas a una misma especie (Batish y Rangathan, 1984).

3.8.1.- Comparación entre Denominaciones

En la figura 27 se indican los porcentajes de las distintas especies de enterococos de las 2 Denominaciones.

Entre ambas Denominaciones no se han encontrado diferencias significativas, al 95% de nivel de confianza, respecto a la distribución de especies, siendo *Enterococcus faecalis* con más de un 85% del total, la especie mayoritaria. *Enterococcus faecium*, con menos del 8% del total es la segunda especie cuantitativamente más importante. *Enterococcus durans* y *Enterococcus avium* tienen una presencia minoritaria, inferior a un 5% tanto en la D.O. Roncal como en la D.O. Idiazábal.

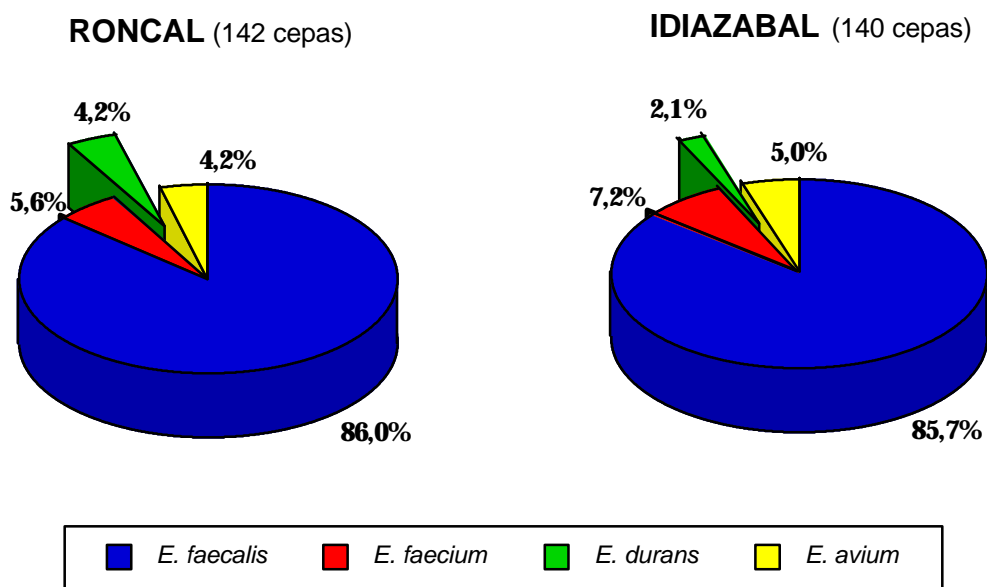


Figura 27.- Porcentaje de especies en 282 cepas de enterococos aisladas de leche y quesos de 4 meses procedentes de 6 queserías: 3 con D.O. Roncal y 3 con D.O. Idiazábal.

Es posible que las cepas de *Enterococcus faecalis* jueguen un importante papel en la maduración de estos quesos ya que, como han señalado algunos autores (Neviani y col., 1982; Trovatelli y col., 1987) estas bacterias son productoras de acetaldehído y diacetilo, compuestos que influyen notablemente en las características organolépticas del queso.

Es de destacar la presencia de *Enterococcus avium* en aproximadamente un 5% de las cepas aisladas. Esta especie se caracteriza por no reducir el azul de metileno y no utilizar el piruvato como fuente de energía (Orvin, 1986a). Así mismo, son capaces de fermentar los carbohidratos: arabinosa, melibiosa, manitol y melicitosa pero no la inulina. *Enterococcus avium* procede principalmente de heces de humanos, pollos, perros y cerdos y puede causar infecciones en el hombre. En el queso Torta del Casar de Cáceres se ha descrito *Enterococcus avium* como la segunda especie de enterococos cuantitativamente más importante, ya que representa el 36,4% de un total de 154 cepas de enterococos identificadas (Pouillet, 1991; Pouillet y col., 1993).

Enterococcus durans se ha considerado algunas veces una variedad de *Enterococcus faecium*, sin embargo estudios de hibridación del ADN han puesto de manifiesto que son especies diferentes. *Enterococcus durans* se ha aislado frecuentemente de leche y derivados lácteos (Colman y col., 1992), por lo que no es de extrañar su presencia en los quesos objeto de este estudio.

El predominio de *Enterococcus faecalis* con respecto a otras especies de enterococos, junto a una menor proporción de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus durans* ha sido señalada en muestras de leche (Batish y Ranganathan, 1984) y en distintos tipos de quesos: Gamonedo (González de Llano y col., 1992), Los Ibóres (Mas y González-Crespo, 1992), Casar de Cáceres (Pouillet y col., 1993) Anthotyro (Kalogridou-Vassiliadou y col., 1994), Mozzarella (Gatti y col., 1993) y Valle Camonica (Garbelli y col., 1984). En el queso Manchego, se han encontrado datos contradictorios. Así, mientras Ordóñez y col (1978a) identificaron un 80% de 157 cepas de enterococos aisladas como *Enterococcus faecalis*, Martínez-Moreno (1976) encontró unas proporciones de *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecalis* de un 50% y un 24% respectivamente. Por otra parte, en el queso Mahón (Ramos y col., 1982; Suárez y col., 1983) y en el queso Feta (Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki, 1992) la especie mayoritaria fue *Enterococcus durans*, mientras en el queso Cabrales resultó ser *Enterococcus faecium* (Núñez y Medina 1979).

Las causas de la gran diferencia encontrada entre distintos tipos de queso con respecto a la distribución de especies de enterococos puede deberse bien a diferencias reales bien a que el medio de cultivo empleado para el aislamiento no ha sido el mismo lo que podría influir considerablemente en la selección de especies.

3.8.2.- Comparación entre queserías

En la tabla 47 se muestra la distribución de las especies en cada quesería. Las diferencias entre las 6 queserías son pequeñas y no llegan a ser significativas. *Enterococcus faecalis* es la especie predominante y representa más del 70% del total de cepas de enterococos identificadas en todas y cada una de las queserías.

Tabla 47.- Distribución de las especies de enterococos aisladas de leche, y quesos de 4 meses procedentes de 6 queserías: 3 con D.O. Idiazábal (Q1, Q2 y Q3) y 3 con D.O. Roncal (Q4, Q5 y Q6).

ESPECIES	QUESERIA						
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
<i>Enterococcus faecalis</i>	n	40	30	50	35	49	38
	%	87,0	71,4	96,2	83,4	96	77,6
<i>Enterococcus faecium</i>	n	3	5	2	3	0	5
	%	6,5	11,9	3,8	7,1	0	10,2
<i>Enterococcus durans</i>	n	0	3	0	0	1	5
	%	0	7,1	0	0	2	10,2
<i>Enterococcus avium</i>	n	3	4	0	4	1	1
	%	6,5	9,5	0	9,5	2	2

n- número de cepas; %- porcentaje del total de cepas de cada quesería.

Se observan sin embargo algunas diferencias en las proporciones de las demás especies: no se ha detectado *Enterococcus durans* en las queserías 1, 3 y 4 ni *Enterococcus faecium* o *Enterococcus avium* en las queserías 5 y 3 respectivamente. Estas diferencias no pueden ser verificadas estadísticamente ya que el número de cepas adscritas a cada una de estas especies no es suficientemente alto. Las variaciones entre las distintas queserías no resultan sorprendentes, si se tiene en cuenta que al proceder de contaminaciones externas su llegada a la leche o al queso durante el proceso de elaboración es totalmente fortuita, como han señalado algunos autores (Ordóñez y col., 1978a; Suárez y col., 1983).

3.8.3.- Comparación entre la leche y los quesos de 4 meses

Al estudiar cada Denominación individualmente se observan diferencias significativas entre la leche y los quesos (figura 28).

En la D.O. Roncal las diferencias significativas se atribuyen a la ausencia de *Enterococcus durans* en los quesos de 120 días, mientras en la leche suponen un porcentaje del 14,3% del total.

En la D.O. Idiazábal se deben a que no se ha descrito ninguna cepa de *Enterococcus faecium* en leche, mientras un 10,2% de las cepas de enterococos procedentes de queso se han incluido en dicha especie.

Parece poco probable que la diferente frecuencia encontrada en leche y queso con respecto a dos especies poco importantes cuantitativamente (*Enterococcus durans* y *Enterococcus faecium*) obedezca a alguna causa determinada, ya que al proceder de contaminación externa su llegada a la leche o al queso es completamente accidental, como se ha mencionado en el apartado 3.8.2. (Suárez y col., 1983).

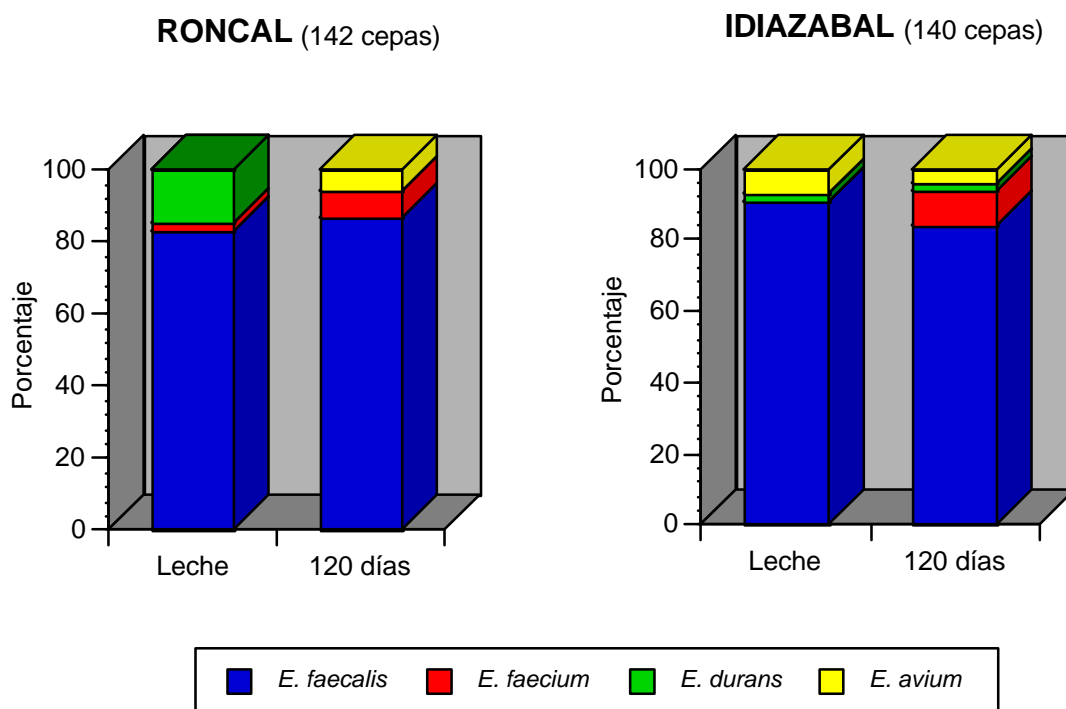


Figura 28.- Porcentaje de especies en 282 cepas de enterococos aislados de leche y quesos de 4 meses procedentes de 6 queserías: 3 con D.O. Roncal y 3 con D.O. Idiazábal.

[illegible]

α -glucosidasa	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
-----------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Cabe destacar que, en general, los enterococos poseen baja actividad enzimática, y únicamente la enzima leucina arilamidasa es capaz de hidrolizar más de 30 nanomoles en presencia del sustrato L-leucil-2-naftilamida.

La actividad lipasa ha sido nula en 12 cepas y mínima en 1, lo que confirma la hipótesis, ya sugerida por algunos autores, de que los enterococos poseen mayor capacidad proteolítica que lipolítica (Chander y col., 1979; Wessels y col., 1990).

A pesar de la ausencia de actividad lipasa, las actividades esterasa y esterasa lipasa son algo más elevadas, presentando valores medios de 8 y 15 nanomoles de sustrato hidrolizado respectivamente. Ambas actividades se han detectado también por métodos electroforéticos, en los que se ha puesto de manifiesto que las especies de *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecalis* muestran preferencia por el sustrato butirato (Tsakalidou y col., 1993).

De las 19 enzimas estudiadas, la enzima leucina arilamidasa es la que presenta niveles de degradación del sustrato más elevados, siendo la enzima más activa en 6 de las 13 cepas ensayadas. También son de destacar por orden cuantitativo las actividades de las enzimas β -galactosidasa, α -glucosidasa, valina arilamidasa y fosfatasa ácida. Las 15 actividades restantes no superan de media los 10 nanomoles de sustrato hidrolizado.

Es importante resaltar la variación que existe entre las distintas cepas a pesar de pertenecer 10 de ellas a la misma especie (*Enterococcus faecalis*).

Estas fluctuaciones, a menudo considerables, también se han observado en bacterias del género *Lactobacillus* (Bouton y col., 1994) y *Lactococcus* (Olivares y col., 1993). Este hecho da una idea del interés que tiene el estudio individual de cada cepa bacteriana antes de seleccionarla para su utilización en la industria quesera (Ter-Kazar' Yan ssh. 1974; Bhowmik y Marth., 1988).

Si bien es cierto que los enterococos presentan actividades enzimáticas bajas comparadas con microorganismos del género *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Requena y col., 1993), el hecho de que sean capaces de resistir a condiciones adversas (altas concentraciones de sal, elevadas temperaturas) y, por lo tanto de sobrevivir más eficientemente, conlleva que la actividad acumulativa de una gran población de enterococos sea significativamente importante en la proteólisis del queso (Jensen y col., 1975).

3.9.2.- Actividad acidificante

La actividad acidificante sobre leche descremada de las cepas de enterococos analizadas se expone en la tabla 49.

Tabla 49.- Actividad acidificante producida en 6 horas a 30 °C (medida en grados Dórnica) de las 13 cepas de enterococos seleccionadas mediante el test Api-Zym.

Actividad acidificante	CEPA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	27,2	24,6	29,5	26,8	31,6	29,4	27,9	29,2	24,6	22,4	29,2	29,0	24,7

Cada resultado constituye la media de 4 análisis y los coeficientes de variación no han sido superiores al 7 %.

Las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 han sido identificadas como *Enterococcus faecalis*; las cepas 11 y 12 como *Enterococcus faecium* y la cepa 13 pertenece a la especie *Enterococcus avium*.

Conforme a la clasificación de Accolas y Auclair (1970), las cepas objeto de este estudio son consideradas como lentas, a excepción de la cepa 5 que alcanza un valor de 31,6 °D y se sitúa dentro del intervalo de acidez media (30-35 °D).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Martínez Moreno (1976) en un estudio con 8 cepas de enterococos donde todas mostraron actividad acidificante lenta.

A pesar de ser consideradas 12 de las 13 cepas como de bajo poder acidificante, se pueden observar diferencias incluso entre cepas adscritas a la misma especie. Estas pequeñas oscilaciones también se han hallado en estudios llevados a cabo con cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas del queso Grana (Cabrini y Carini, 1982) y con cepas de *Lactococcus lactis* subsp.*diacetylactis* (Olivares y col., 1993).

La influencia de la actividad acidificante de las bacterias lácticas en las características fisicoquímicas y organolépticas del queso ha sido probada.

Quesos elaborados con cepas de *Lactococcus lactis* de alta capacidad acidificante provocan una mayor producción de ácido láctico. Este favorece el desuerado de la cuajada produciendo un aumento de extracto seco. La valoración organoléptica que obtienen los quesos a los que se ha adicionado dichas cepas es superior (Núñez y col., 1981). Sin embargo, un exceso de acidificación tampoco es deseable, ya que los quesos con pH inferiores a 5 se caracterizan por poseer una textura demasiado seca al eliminar agua en exceso.

3.9.3.- Concentración de proteína

Es importante cuantificar la cantidad de proteína de las cepas de enterococos con el fin de expresar la actividad enzimática en función de ésta, ya que se ha constatado como la mejor manera de poder comparar resultados posteriormente (Requena y col., 1991).

En la tabla 50 se muestran los miligramos de proteína por mililitro de las suspensiones obtenidas de células enteras y de extracto libre de células.

Tabla 50.- Cantidad de proteína (miligramos de proteína por mililitro) en los extractos utilizados en los ensayos.

Cepa	Células enteras	Extracto citoplasmático
1	6,03	4,19
2	4,09	3,19
3	5,95	2,30
4	4,33	2,48
5	6,93	1,33
6	7,25	2,14
7	4,22	2,95
8	4,70	2,50
9	4,00	2,27
10	4,94	3,92
11	5,90	2,84
12	6,98	1,09
13	4,22	2,95

Cada resultado constituye la media de 4 análisis y los coeficientes de variación no han sido superiores al 13 %, resultando en un 30% de los casos inferiores al 5%.

En las células enteras los resultados oscilan entre 3,86 y 7,25 miligramos de proteína por mililitro y en los extractos libres de células entre 1,09 y 4,19. En todas las cepas es siempre mayor la concentración de proteína en las suspensiones con células enteras.

3.9.4.- Actividad aminopeptidasa

En las tablas 51 y 52 se muestran los resultados de la actividad aminopeptidasa de la pared celular y citoplasmática que presentan las cepas de enterococos, ensayadas tanto a pH 5,5 como a pH 7. Los sustratos utilizados han sido leucina-p-nitroanilida y lisina-p-nitroanilida.

Tabla 51.- Actividad aminopeptidásica (1) de la pared celular de 13 cepas de enterococos (2) sobre los sustratos leucina-p-nitroanilida (p-Leu) y lisina-p-nitroanilida (p-Lys) a pH 5,5 y 7.

Cepa	p-Leu pH 5,5	p-Leu pH 7	p-Lys pH 5,5	p-Lys pH 7
1	6,92	11,49	15,30	15,93
2	36,77	42,20	42,40	34,35
3	3,18	8,03	5,08	6,80
4	32,30	38,60	11,23	50,94
5	238,53	446,19	101,38	457,05
6	125,64	307,44	66,28	235,75
7	42,28	43,46	38,46	49,39
8	24,66	28,02	17,23	52,10
9	2,13	9,35	0,68	15,09
10	179,67	305,63	97,10	269,03
11	231,84	479,06	95,37	458,86
12	38,66	113,75	20,14	117,58
13	11,46	19,10	6,86	35,09

(1) Expresada en nanomoles de sustrato hidrolizado por hora y por miligramo de proteína.

(2) Las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 han sido identificadas como *Enterococcus faecalis*; las cepas 11 y 12 como *Enterococcus faecium* y la cepa 13 pertenece a la especie *Enterococcus avium*.

Todos los datos señalados en las tablas constituyen la media de 4 ensayos. Los coeficientes de variación no han sido superiores al 13%, resultando en un 67% de los casos inferiores al 5%.

La actividad aminopeptidasa encontrada es baja, comparada con la que presentan algunos géneros de bacterias lácticas. Es preciso, por ello, utilizar unidades del rango de nanomoles de sustrato degradados,

mientras que en trabajos llevados a cabo con lactococos y lactobacilos se indican los resultados en micromoles, obteniéndose de esta manera cifras similares.

Tabla 52.- Actividad aminopeptidásica (1) citoplasmática de 13 cepas de enterococos (2) sobre los sustratos leucina-p-nitroanilida (p-Leu) y lisina-p-nitroanilida (p-Lys) a pH 5,5 y 7.

Cepa	p-Leu pH 5,5	p-Leu pH 7	p-Lys pH 5,5	p-Lys pH 7
1	2,47	3,53	2,62	2,74
2	32,23	48,85	37,15	48,26
3	8,09	48,32	11,66	16,05
4	27,53	24,52	39,57	62,82
5	1119,62	1784,01	980,97	1405,49
6	510,82	710,45	497,92	695,05
7	3,50	10,64	5,20	2,72
8	90,88	75,73	117,16	213,70
9	8,37	36,57	10,81	23,14
10	388,17	1164,32	318,99	1565,76
11	575,47	650,92	331,54	634,48
12	424,04	1358,99	361,27	808,35
13	2,48	6,12	4,35	6,24

(1) Expresada en nanomoles de sustrato hidrolizado por hora y por miligramo de proteína.

(2) Las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 han sido identificadas como *Enterococcus faecalis*; las cepas 11 y 12 como *Enterococcus faecium* y la cepa 13 pertenece a la especie *Enterococcus avium*.

Se citan a continuación, a modo comparativo, algunos datos que aparecen en la bibliografía sobre la actividad aminopeptidásica en otros géneros de bacterias:

Kamaly y Marth (1988) determinaron la actividad aminopeptidasa sobre los sustratos lisina-p-nitroanilida y leucina-p-nitroanilida de dos cepas de *Lactococcus lactis* y obtuvieron valores de 134,85 y 228,90 para el primer sustrato y de 111,27 y 137,28 para el segundo, expresados en micromoles de sustrato

hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína en el extracto libre de células. Estos resultados son representativos de la poca actividad que presentan los enterococos con respecto a los lactococos.

Requena y col. (1993) midieron la actividad aminopeptidásica de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* y detectaron actividades entre 800 y 33.000 nanomoles de paranitroanilida liberados por minuto y por miligramo de proteína.

Por otra parte, se han descrito las actividades aminopeptidásicas intracelulares de lactobacilos del grupo *Thermobacterium*: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus bulgaricus* y han resultado ser menores que las descritas en los enterococos (El Soda y Desmazeaud, 1992).

Las exopeptidasas (aminopeptidasas, dipeptidasas...) de las bacterias provocan la degradación de los péptidos grandes, responsables de sabores amargos, a aminoácidos que no producen este desagradable sabor. Se ha observado que al añadir cepas de *Lactobacillus helveticus* con baja capacidad aminopeptidásica en la elaboración del queso Emmental aparece un cierto amargor en el queso, que desaparece con la utilización de cepas de mayor capacidad aminopeptidásica (Prost y Chamba, 1994).

La escasez de publicaciones sobre las actividades enzimáticas de los enterococos no permite contrastar los resultados del presente trabajo con otros similares.

Resulta paradójica la ausencia de bibliografía si se tiene en cuenta la importancia que muchos autores les atribuyen al aconsejar su inclusión en los fermentos.

Hagress y col. (1991) afirman que *Enterococcus faecalis* podría ser utilizado como starter en la elaboración del queso debido a su alta capacidad para producir acetilo y diacetilo, compuestos que proporcionan unas buenas cualidades organolépticas al producto.

Así mismo, Litopoulou-Tzanetaki y col. (1993) concluyen en su trabajo sobre el queso Feta que la utilización de fermentos mesófilos suplementados con *Enterococcus durans* contribuye a una mejora de la textura y sabor del queso.

Se ha sugerido que en quesos elaborados con concentraciones altas de sal, la adición de enterococos como bacterias iniciadoras podría compensar posibles problemas de producción de ácido por parte de la flora habitual del fermento como consecuencia del efecto inhibitorio que en éstas provoca la sal (Jensen, 1975).

A su vez, Cabrini y Carini (1982) subrayan la propiedad de las especies de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* de atacar débilmente la micela caseínica, con producción de oligopéptidos y aminoácidos que favorecen el desarrollo de las bacterias lácticas y en particular de la flora termófila del queso Grana.

3.9.4.1.- Comparación entre cepas

10 de las 13 cepas estudiadas pertenecen a la especie *Enterococcus faecalis*, 2 han sido identificadas como *Enterococcus faecium* (11 y 12) y 1 como *Enterococcus avium* (13). Como se observa en las tablas 51 y 52 las diferencias encontradas entre cepas de una misma especie son muy elevadas, pudiendo incluso variar de 500 a 1 para la actividad citoplasmática leucina aminopeptidasa. Estas diferencias son del mismo orden a las detectadas entre especies, lo que indica que no es posible caracterizar las especies por su actividad aminopeptidasa.

La variabilidad entre cepas de la misma especie ha sido puesta de manifiesto por varios autores:

Beauquesne y Cantéri (1982) comparan la actividad aminopeptidásica de varias cepas de *Lactococcus cremoris* y obtienen una variación de la actividad de 1 a 3.

Tskalidou y col. (1993) midieron la actividad aminopeptidasa de 2 cepas de *Streptococcus thermophilus* sobre 6 sustratos distintos y observaron que era considerablemente distinta entre ambas cepas.

Así mismo, Requena y col (1993) detectaron en dos cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* diferentes valores de actividad aminopeptidasa utilizando 5 sustratos distintos.

En estudios realizados con 4 cepas de *Lactobacillus helveticus* también aparecen diferencias de 1 a 8 en el seno de la misma especie (Schmidt y col., 1994).

En bacterias del género *Micrococcus*, se han registrado valores comprendidos entre 6 y 24.230 micromoles de lisina y leucina hidrolizados por minuto y por miligramo de proteína (Bhowmik y Marth, 1988).

Esta disparidad en las actividades aminopeptidásicas entre cepas de la misma especie confirma, como se ha mencionado en el apartado 3.9.1. la necesidad de efectuar estudios individuales de cada cepa, con el fin de poder realizar una selección adecuada de las bacterias a incluir en el fermento (Beauquesne y Cantéri, 1982).

3.9.4.2.- Localización celular

Como se muestra en las tablas 51 y 52 la actividad aminopeptidasa citoplasmática de los enterococos es más elevada que la de la pared celular en 8 de las 13 cepas ensayadas. Las cepas 1, 7 y 13 presentan mayor actividad en la pared celular y las cepas 2 y 4 muestran cantidades variables dependiendo del pH y del sustrato presente en el medio.

Crow y col. (1993) obtuvieron conclusiones similares al constatar en cepas de *Streptococcus thermophilus* una localización de las peptidasas principalmente citoplasmática, aunque posiblemente parte de la actividad tripeptidasa podría estar asociada a estructuras celulares. Cabe señalar, como se ha puesto de manifiesto en el presente trabajo, que estos autores no encontraron correlación entre la actividad peptidasa de las diferentes cepas y la capacidad de éstas de producir ácido. En dicho estudio, se señala que el conocimiento de las proteinasas de la pared celular de los lactococos y de los sistemas de transporte de péptidos y aminoácidos ha puesto de manifiesto la necesidad de que, al menos, algunos tipos de actividad peptidasa se localicen en el exterior de la célula para que la bacteria pueda satisfacer sus requerimientos nutricionales. Esta podría ser una posible explicación de la actividad aminopeptidásica extracelular detectada en los enterococos en este trabajo.

Estudios realizados con *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* han demostrado que en estas especies la actividad aminopeptidasa también se localiza principalmente en el interior de la célula (Khalid y Marth, 1990a).

Resultados diferentes encontraron Kalantzopoulos y col. (1990) en cepas de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Estos autores detectaron actividad aminopeptidasa, por técnicas electroforéticas, tanto en la pared celular como en el extracto intracelular. A pesar de existir variaciones dependiendo de las cepas, generalmente fue superior la actividad en las aminopeptidasas ligadas a la envuelta celular.

3.9.4.3.- Influencia del pH

En 48 de las 52 actividades analizadas (92,3%) la actividad a pH 7 fue bastante superior a la registrada a pH 5,5 para el mismo sustrato y la misma suspensión de enzimas. Este hecho indica que en las condiciones de pH habituales en los quesos de este estudio, la actividad aminopeptidasa de los enterococos es inferior a la óptima.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos para otros grupos bacterianos, como el género *Lactococcus*.

Se ha visto que *Lactococcus lactis* posee un óptimo de actividad aminopeptidasa a pH alto (7-8) (Visser, 1993).

Por otra parte, en cepas de *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris*, Kamaly y Marth (1988) han puesto de manifiesto que la actividad a pH 6,5 es superior a la de pH 6.

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir, como varios autores (Giori y col., 1985; Ezzat y col., 1986)) afirman, que la actividad proteolítica de las bacterias se ve fuertemente influida por las variaciones de pH. La relación entre actividad y pH no es de extrañar si se tiene en cuenta que el pH es capaz de cambiar el equilibrio del ion hidrógeno en el sitio activo del enzima y por lo tanto de alterar la estructura de éste como indicaron Cowman y col. (1967).

3.9.4.4.- Influencia del sustrato

Algunas de las cepas de enterococos poseen más actividad en presencia del aminoácido hidrófobo leucina, mientras otros catalizan preferentemente la hidrólisis de la lisina.

La preferencia por uno u otro aminoácido es independiente de la localización celular de las aminopeptidasas y del pH.

Es necesario tener en cuenta que sin una estricta purificación de cada enzima, los niveles de actividad para cada sustrato no pueden ser atribuibles exclusivamente a un único enzima. Sin embargo, en la medida de lo posible, los sustratos utilizados se eligieron en base a su especificidad y se pueden considerar como indicativos de las actividades enzimáticas ensayadas, como Crow y col. (1994) señalaron.

Las variaciones de afinidad por el sustrato dependiendo de las cepas se han puesto de manifiesto en otros géneros de bacterias:

Bhowmik y Marth (1988) midieron la actividad aminopeptidasa sobre los sustratos lisina-p-nitroanilida y leucina-p-nitroanilida en 9 cepas de *Micrococcus*, 8 cepas mostraron mayor actividad lisina aminopeptidasa, sin embargo una, la que poseía mayor actividad, catalizaba principalmente la hidrólisis del sustrato leucina-p-nitroanilida.

En cepas de *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* se han registrado valores más altos para la actividad leucina aminopeptidasa, que para otros sustratos (El Soda y Desmazeaud, 1982, Requena y col., 1993). En dichos trabajos se señala una preferencia de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* por la lisina.

3.9.5.- Actividad proteolítica

En la tabla 53 se indican los valores de actividad proteinasa de la pared celular y del citoplasma de 13 cepas de enterococos. Todos los datos constituyen la media de 4 ensayos. Los coeficientes de variación no han sido superiores al 12%, resultando en un 60% de los casos inferiores al 5%.

Tabla 53.- Actividad proteinasa caseinolítica (1) de la pared celular y del extracto citoplásmático de 13 cepas de enterococos.

Cepa	Células enteras	Extracto citoplasmático
1	49,7	51,9
2	582,6	593,4
3	27,8	44,3
4	147,5	75,8
5	287,9	174,8
6	112,2	134,7
7	156,3	33,7
8	25,6	48,9
9	203,8	23,0
10	19,9	28,6
11	96,8	59,8
12	187,7	76,1
13	156,8	64,6

(1) Los datos se expresan en nanomoles de leucina liberados por hora y por miligramo de proteína

(2) Las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 han sido identificadas como *Enterococcus faecalis*; las cepas 11 y 12 como *Enterococcus faecium* y la cepa 13 pertenece a la especie *Enterococcus avium*.

3.9.5.1.- Comparación entre cepas

Las diferencias de actividad caseinolítica entre las distintas cepas son considerables, oscilando los valores en 12 de las 13 cepas entre 20 y 200 nanomoles de leucina liberados por hora y por miligramo de proteína en el extracto. La cepa 2 supera ampliamente ese nivel, liberando aproximadamente 600 nanomoles, en las mismas condiciones.

Los escasos datos que existen sobre actividades proteolíticas en enterococos corroboran la diversidad en los niveles de actividad proteolítica entre distintas cepas de la misma especie.

Carrasco de Mendoza y col. (1988, 1989) determinaron la actividad caseinolítica de 60 cepas pertenecientes a 3 especies y observaron que esta actividad es propia de cada cepa en particular y que existen considerables variaciones, aún dentro de una especie. A las 6 horas de incubación los valores registrados para las distintas cepas de *Enterococcus faecalis* oscilaron entre 0,001 y 0,5 mg de tirosina por mililitro de extracto.

Cabrini y Carini (1982), en 6 cepas de *Enterococcus faecalis* y 1 cepa de *Enterococcus faecium* midieron valores de actividad proteolítica comprendidos entre 6 y 42,2 microgramos de tirosina por mL. A su vez, las actividades proteolíticas de 10 cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas de una leche fermentada oscilaron entre 2,7 y 5,3 microgramos de tirosina por mililitro a las 7 horas de incubación (Hagrass y col., 1991).

Es de destacar, que los resultados de los trabajos anteriormente mencionados vienen dados en distintas unidades a las utilizadas en este estudio por lo que no es posible una comparación cuantitativa. En el presente estudio se han adoptado las unidades: nanomoles de leucina liberados por hora y por miligramo de proteína en el extracto, por considerar el método empleado, con sus respectivas unidades más adecuado.

La variabilidad en función de las cepas, se ha constatado también en fabricaciones experimentales de quesos. Las cepas más proteolíticas "in vitro" originan una hidrólisis más pronunciada a lo largo del afinado (Schmidt y col., 1994).

Beauquesne y Canteri (1982) encontraron diferencias importantes en las actividades proteolíticas entre cepas de *Lactococcus lactis*. Así mismo, no observaron ninguna correlación entre la actividad acidificante y la actividad proteolítica en distintas especies de estreptococos y lactobacilos. Estos resultados concuerdan con los de este estudio y con los obtenidos por Coolbear y col. (1994) en cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Streptococcus thermophilus*. Estos autores observaron que el nivel de actividad proteinasa asociada a la superficie celular no se correlaciona con la tasa de producción de ácido en

leche, ya que algunas cepas de acidificación lenta, poseen un nivel similar e incluso superior de actividad proteinasa que las cepas de acidificación rápida.

Este estudio y los trabajos mencionados anteriormente confirman la necesidad de medir la actividades proteolíticas de cada cepa individualmente, ya que los péptidos y aminoácidos liberados por las distintas enzimas guardan una estrecha relación con la intensidad del sabor en el queso (Kaminogawa y col., 1986).

El hecho de que las cepas con mayor actividad aminopeptidásica no se correspondan con las que presentan más elevada actividad proteinasa concuerda con las afirmaciones de algunos autores. Desmazeaud y Vassal, (1979) pusieron en evidencia con 9 cepas de lactococos que no es posible establecer ninguna relación entre la actividad caseinolítica y la actividad leucina aminopeptidasa. En dicho trabajo se sugiere que las cepas más proteolíticas producen una cuajada más firme.

3.9.5.2.- Localización celular

En 7 de las 13 cepas ensayadas, la actividad proteinasa se ha localizado principalmente en la pared celular y en las 6 restantes en el citoplasma.

La distribución de la actividad proteinasa en la célula ofrece resultados variables en la bibliografía.

Carrasco de Mendoza (1989) comparó la actividad caseinolítica exocelular de los enterococos con la actividad endocelular y obtuvo valores marcadamente superiores para aquellos.

Resultados similares se han descrito en cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* donde se ha comprobado que las proteinasas se localizan principalmente en la pared celular (Kok, 1993, Visser, 1993).

Por otro lado, en cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y de *Streptococcus thermophilus* se ha detectado una actividad proteolítica 10 veces superior en el extracto libre de células que en la pared celular. A su vez estos niveles han sido superiores a los registrados en el presente trabajo (Kalantzopoulos y col., 1990).

Posteriores estudios realizados utilizando sustratos marcados con sustancias fluorescentes han confirmado la existencia de actividad proteinasa tanto en la superficie de las células como en el interior de éstas (Crow y col., 1993). Se han descrito 4 proteinasas caseinolíticas localizadas intracelularmente en cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (dos metaloenzimas, una proteinasa cisteína y una proteinasa serina) (Akuzawa y col., 1990).

Así mismo, se ha sugerido que parte de la actividad asociada con la superficie celular permanece inactiva o enmascarada de alguna manera hasta que se produce la rotura de la pared celular.

La actividad proteolítica extracelular de *Enterococcus faecalis* parece estar asociada a una metaloproteinasa extracelular de 35 KDa (Pritchard y Coolbear, 1993) capaz de hidrolizar la caseína de la leche. La adición de esta proteinasa a cubas que contienen leche aumenta la cantidad de péptidos y polipéptidos liberados. Cantidades grandes de esta enzima producen defectos en el queso. Es necesario, por ello, determinar la dosis necesaria de enzima para ser añadida y obtener los efectos deseados a lo largo del proceso de maduración del queso (García de Fernando y col., 1992).

4.- CONCLUSIONES

A la vista de los resultados señalados se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Se ha constatado que existen diferencias entre la Denominación de Origen Roncal y la Denominación de Origen Idiazábal para todos los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos medidos en la leche de partida, excepto para la materia grasa y el nivel de leuconostoc. Estas diferencias provienen, en gran parte, de las encontradas entre queserías, ya que se ha observado mucha heterogeneidad entre las queserías adscritas a la Denominación de Origen Roncal, mientras que las acogidas a la Denominación de Origen Idiazábal muestran mayor uniformidad.
2. El elevado nivel de carga microbiana que presenta la leche recogida en varias de las queserías estudiadas, pone de manifiesto la necesidad de establecer medidas de control, higiene y pago por calidad microbiológica.
3. Se han constatado diferencias entre las queserías en los quesos de 120 días en cuanto al parámetro materia grasa sobre extracto seco. Sin embargo, todas las queserías superan el mínimo exigido en sus respectivas Reglamentaciones. La diferente Reglamentación vigente en ambas Denominaciones para este parámetro en el producto final no se apoya en datos reales a la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo.
4. Las diferencias con respecto a los parámetros microbiológicos observadas en la leche de las queserías acogidas a la Denominación Origen Roncal son más pronunciadas que las encontradas en los quesos de 120 días. Esta amortiguación de las desigualdades se atribuye a que el proceso de elaboración y maduración de los quesos es parecido en todas ellas, lo que influye notablemente en la flora capaz de desarrollarse.
5. Se ha apreciado que los datos de: pH, flora aerobia mesófila, enterobacterias, coliformes, lactococos, lactobacilos y enterococos en leche no permiten predecir los valores de dichos parámetros en los quesos de cuatro meses de maduración, ya que únicamente para la materia grasa y el nivel de leuconostoc se encuentran correlaciones significativas. Es posible, sin embargo predecir a partir de quesos en los primeros estadios de maduración algunos parámetros en el producto final.

6. Con relación a la evolución de los parámetros considerados en los quesos a lo largo del periodo de maduración, se ha constatado que no es posible caracterizar los quesos en función de la Denominación que los ampara. Es por ello necesario, poder llegar a determinar unos criterios que permitan obtener un producto bien definido y lo más homogéneo posible.
7. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* es la especie de lactococos predominante en todas las queserías estudiadas. Por ello, son precisos estudios detallados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a nivel de cepas, tanto procedentes de la leche cruda como de los propios cultivos iniciadores.
8. *Lactobacillus casei* se ha descrito como la especie de *Lactobacillus* mayoritaria en la Denominación de Origen Roncal, mientras que en las queserías adscritas a la Denominación de Origen Idiazábal el porcentaje de *Lactobacillus plantarum* es ligeramente superior al de *Lactobacillus casei*. Por consiguiente, la distribución de estas especies se puede considerar como una característica que contribuya a definir ambos tipos de quesos. Así mismo, se considera de interés el estudio de las actividades enzimáticas de ambas especies.
9. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* son las especies de leuconostoc cuantitativamente más importantes en las dos Denominaciones. Las diferencias en la distribución de especies que se observan entre las Denominaciones se deben principalmente a la heterogeneidad entre queserías. Por ello, se considera que el estudio individualizado de las especies de leuconostoc de cada quesería aporta, de cara a trabajos posteriores, mayor información que el de las Denominaciones.
10. *Enterococcus faecalis* es la especie de *Enterococcus* predominante en todas las queserías estudiadas. Este hecho junto con los elevados recuentos de enterococos descritos en los quesos con Denominación de Origen Roncal e Idiazábal, permiten concluir que *Enterococcus faecalis* pueda jugar un papel importante en la maduración del queso, por lo que se sugiere continuar profundizando en el conocimiento de esta especie.

11. Las diferencias encontradas entre cepas de una misma especie de enterococos en cuanto a la actividad aminopeptidasa y proteolítica muestran mucha variabilidad en función del sustrato o de la localización celular y son del mismo orden a las detectadas entre cepas de diferentes especie. De estos resultados, por una parte, se deduce que no es posible caracterizar las especies en función de su actividad enzimática y, por otra parte, se pone de manifiesto la necesidad de efectuar estudios individuales de cada cepa, con el fin de poder realizar una selección adecuada de estas bacterias.
12. La actividad aminopeptidasa de los enterococos a pH 7 es bastante superior a la registrada a pH 5,5. Este hecho indica que en las condiciones de pH habituales en los quesos de este estudio, la actividad aminopeptidasa de los enterococos es inferior a la óptima.

6.- BIBLIOGRAFIA

- ABDEL BAKY, A.A., EL-NESHAWY, A.A., RABIE, A.M. y ASHOUR, M.M. (1986). Heat-shocked Lactobacilli for accelerating flavour development of Ras cheese. *Food Chem.* 21, 301-313.
- ABO-ELNAGA, I.G. y PLAPP, R. (1987). Peptidases of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Basic Microbiol.* 27, 123-130.
- ACCOLAS, J.P. y AUCLAIR, J. (1970). Determination de l'activité acidifiant des suspension concentrées congelées de bacteries lactiques. *Lait* 50, 499-500.
- AKUZAWA, R., YOKOYAMA, K., MATSUSHI, M. y OKITANI, A. (1990). Isolation and partial characterization of intracellular proteinases in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IAM 1198. *J. Dairy Sci.* 73, 3385-3392.
- ALAIS, C.H. (1985). Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Editorial Reverté S.A. Barcelona.
- ARIZCUN, C., ROMANO, A., BARCINA, Y. y TORRE, P. (1993). Microbiological parameters of the hygienic quality of ewes'milk and cheese elaborated from it according to the regulations of the Origin Denominations of Navarra cheese. 1st World Congress of Dairy Products in Human Health and Nutrition. Madrid.
- ASSENAT, L. (1991). Leche y productos lácteos: vaca, oveja y cabra. Vol 1: La leche. De la mama a la lechería. Ed. F.M. Luquet y Y. Bonjean-Linckowski. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza.
- ATLAN, D., LALOI, P. y PORTALIER, R. (1990). X- prolyl-dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: characterization of the enzyme and isolation of deficient mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (7), 2174-2179.
- AXELSSON, L.T. (1993). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En "Lactic Acid Bacteria". Ed. S. Salminen y A. Von Wright. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
- BARCINA, Y., RODRÍGUEZ, L., ROS, G. y RINCÓN, F. (1988). Evolución de la microflora durante la maduración del queso Idiazábal. *Alimentaria* 196, 37-40.
- BARNES, E. M. (1956). Method for the isolation of faecal *streptococci* (Lancefield group D) from bacon factories. *J. Appl. Bacteriol.* 19, 193-203.
- BATISH, V.K., CHANDER, H. y RANGANATHAN, B. (1985). Factors affecting enterotoxin production by thermonuclease positive *Streptococcus faecium* IF-100 isolated from infant food. *J. Food Sci.* 50, 1513-1514, 1521.
- BATISH, V.K. y RANGANATHAN, B. (1984). Occurrence of *Enterococci* in milk and milk products. II. Identification and characterization of prevalent types. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 19, 189-196.
- BEAUQUESNE, D. y CANTÉRI, G.A. (1982). Proteolytic activity of lactic acid producing strains supplied to the dairy industry. *Revue laitière Française* 407, 19-23.

- BÉLIARD, E., THUAULT, D. y BOURGEOIS, C. (1991). Propriétés inhibitrices des bactéries lactiques. En "Les Bactéries Lactiques. Actes du colloque Lactic 91". pp 205-212. Centre de publications de L'Université de Caen.
- BENGOCHEA, J. (1989). Los fermentos lácticos en quesería. *Industrias Lácteas Españolas* 127, 67-72.
- BERDAGUE, J. L. y GRAPPIN, R. (1987). Affinage et Calité du Gruyère de Comté. II. Influence de l'affinage sur l'évolution des caractéristiques physico-chimiques des fromages. *Lait* 67 (2), 237.
- BERGÈRE, J. L., GURET, P. H., HERMIER, J. y MOCQUOT, G. (1968). Les clostridiums de groupe butyrique dans les produits laitiers. *Annales du Institut Pasteur de Lille* 19, 41-59.
- BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1986). Ed. P.H.A. Sneath, N. Mair, E. Sharpe y J. Holt. Williams y Wilkins. Londres.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (eighth edition) (1976). Ed. J. Holt, N.R. Krieg, P. H.A. Sneath, J.T. Staley y, S.T. Williams. Williams y Wilkins. Londres.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (ninth edition) (1994). Ed. J. Holt, N.R. Krieg, P. H.A. Sneath, J.T. Staley y, S.T. Williams. Williams y Wilkins. Londres.
- BHOWMIK, T. y MARTH, E.H. (1988). Protease and peptidase activity of *Micrococcus* species. *J. Dairy Sci.* 71, 2358-2365.
- BOCKELMANN, W., FOOBKER, M. y TEUBER, M. (1991). Purification and characterization of the X-prolyl-di-peptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*. *Int. Dairy J.* 1, 51-66.
- BOCKELMANN, W., SCHULTZ, Y. y TEUBER, M. (1992). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Int. Dairy J.* 2, 95-107.
- BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO N°162 de 8 de julio de 1995. Orden de 27 de junio de 1985, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación por la que se establece el pago de la leche en función de su composición y su calidad higiénica. Recuento de microorganismos. Anejo 3. Norma Española UNE 34 - 805/1983.
- BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO N°63 de 14 de marzo de 1991. Orden de 11 de marzo de 1991, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación Origen "Roncal" y su Consejo Regulador (Navarra).
- BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO N°289 de 3 de diciembre de 1993. Orden de 30 de noviembre de 1993, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación Origen "Idiazábal" y su Consejo Regulador.

- BONASSI, I.A., GOLDONI, J.S. y KROLL, L.B. (1983). Influência das bactérias lácticas mesófilas: *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus diacetyactis* e *Leuconostoc citrovorum* nos características do queijo tipo Minas. Propiedades organolépticas. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3 (1), 24-34.
- BOTAZZI, V. (1993). Microbiología Lattiero-Casearia. Edagricole-Edizioni Agricole. Bologna. Roma.
- BOTAZZI, V. y LEDDA, A. (1967). Microbiología del formaggio Pecorino "romano". Nota 1ª- Studio sulla microflora dello scotta-fermento usato nella produzione del Pecorino "romano". *Ann. Microbiol.* 8, 42-48.
- BOUTON, Y., GUYOT, P., DASEN, A. y GRAPPIN, R. (1994). Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté. II. Applications en sites industriels. *Lait* 74, 33-46.
- BRITO, C. (1990). Cultivos lácticos, su influencia sobre la calidad físico-organoléptica de los quesos. *Alimentos* 3 (5), 61-64.
- BROOME, M.C., KRAUSE, D.A. y HICKEY, M.W. (1990). The use of non-starter *Lactobacilli* in Cheddar cheese manufacture. *Aus. J. Dairy Tech.* 45 (2), 67-72.
- BRULE, G. y LENOIR, J. (1990). La coagulación de la leche. En "El Queso". Ed. A. Eck. Ediciones Omega. Barcelona.
- BUCHANAN, R.E. y GIBBONS, N.E. (1974). En "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ª edición. pp 490-511. Williams and Wilkins. Baltimore.
- CABALLERO, M., ARROYO, J.A. y YUBERO, A. (1986). Microbiología del queso tipo Camembert fabricado en España. *Rev. Esp. Lech.* 10, 31-39.
- CABRINI, A. y CARINI, S. (1982). Tecnología del grana. I.- La sosta in bacinella. *L'industria del latte* 18 (3/4), 3-23.
- CALVO, M.M. (1990). Procesos proteolíticos durante la maduración del queso. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 10, 179-187.
- CARRASCO DE MENDOZA, M., BASILICO, J.C. y POMAR, F.T. (1979). Sobre el aislamiento e identificación de enterococos. Estudio de sus aptitudes tecnológicas. Primera comunicación. Revista Facultad de Ingeniería Química de Santa Fe (Argentina) 43, 15-24.
- CARRASCO DE MENDOZA, M., MEINARDI, C.A. y SIMONETTA, A.C. (1985). Métodos de ruptura de células de enterococos para determinar su actividad caseinolítica endocelular. Revista de la Facultad de Ingeniería Química de Santa Fe (Argentina) 47, 13-17.
- CARRASCO DE MENDOZA, M., MEINARDI, C.A. y SIMONETTA, A.C. (1988). Actividad caseinolítica endocelular de enterococos para starters lácticos. *Revista Argentina de Lactología* 1 (1), 45-55.

- CARRASCO DE MENDOZA, M., MEINARDI, C.A. y SIMONETTA, A.C. (1989). Actividad caseinolítica exocelular de enterococos para starters lácticos. *Revista Argentina de Lactología* 2 (2), 28-37.
- CASEY, M.G. y MEYER, J. (1985). Presence of X-Prolín-dipeptidil-peptidasa in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 68, 3212-3215.
- CASTBERG, H.B. y MORRIS, H.A. (1976). Degradation of milk proteins by enzymes from lactic acid bacteria used in cheese making. A review. *Milchwiss.* 31 (2), 85-89.
- CLEMENTI, F., CENCI COGA, B.T. y DI ANTONIO, E. (1994). Il formaggio Pecorino umbro di produzione artigianale. Valutazione degli aspetti microbiologici. *Latte* 19 (6), 575-580.
- COGAN, T.M. (1981). Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *J. Dairy Res.* 48, 489-495.
- COGAN, T.M. (1987). Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* ssp. effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.* 63, 551-558.
- COGAN, T.M. y DALY, C. (1987). Cheese starter cultures. En "Cheese: chemistry, physics and microbiology". Vol 1". Ed. P.F. Fox. Elsevier Applied Science. Londres.
- COGAN, T.M. y HILL, C. (1993). Cheese starter cultures. En "Cheese: chemistry, physics and microbiology". Vol 1". Ed. P.F. Fox. Editorial Chapman and Hall. Londres.
- COLMAN, G., EFSTRATION, A. y MORRISON, D. (1992). *Streptococci* and related organisms. En "Identifications methods in applied and environmental microbiology". pp 221-249. Ed. R.G. Board, D. Jones y F.A. Skinner. Blackwell Scientific Publications. Londres.
- COLLINS, M.D., WILLIAMS, A.M. y WALLBANKS, S. (1990). The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16 rRNA sequence analysis: description of *Tetra-genococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 70, 255-262.
- COLLINS, M.D., RODRIGUES, U., ASH, C., AGUIRRE, M., FARROW, J.A.E., MARTÍNEZ-MURCIA, A., PHILIPS, B.A., WILLIAMS, A.M. y WALLBANKS, S. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S r RNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77, 5-12.
- COOLBEAR, T., PILLIDGE, C.J. y CROW, V. (1994). The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid starter bacteria: 1. Resistance to cell lysis and levels and cellular distribution of proteinase activities. *Int. Dairy J.* 4, 697-721.
- COUSINS, C.M. (1978). Milking techniques and the microbial flora of milk. XX International Dairy Congress. Paris: Congress lecture.
- COUSINS, C.M. y BRAMLEY, A.J. (1981). En "Microbiología lactológica, Vol I. La microbiología de la leche". Ed. R.K. Robinson. Applied Science Publishers. Londres.

- COWMAN, R.A., SWAISGOOD, H.E. y SPECK, M.L. (1967). Proteinase enzyme systems of lactic streptococci. II. Role of membrane proteinase in cellular function. *J. Bacteriol.* 94, 942-948.
- COX, W.A. (1977). Characteristics and use of starter cultures in the manufacture of hard pressed cheese. *J. Soc. Dairy Technol.* 30, 5-15.
- CROW, V.L., COOLBEAR, T., HOLLAND, R., PRITCHARD, G.G. y MARTLEY, F.G. (1993). Starters as finishers: starter properties relevant to cheese ripening. *Int. Dairy J.* 3, 423-460.
- CROW, V.L., HOLLAND, R., PRITCHARD, G.C. y COOLBEAR, T. (1994). The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid starter bacteria: II. The levels and subcellular distribution of peptidase and esterase activities. *Int. Dairy J.* 4 (8), 723-742.
- CURK, M.C., BOEUFGRAS, J.M., DECARIS, B., GAVINI, F., KERSTERS, K., LARPENT, J.P., BOURGEOIS, P., RENAULT, P., ROISSART, H. y ROUVIER, C. (1994). Méthodes d'identification des bactéries lactiques. En "Les Bactéries Lactiques. Vol I". Ed. H. Roissart y F.M. Luquet. Editorial Lodice. Uriage. Francia.
- CHANDER, H., RANGANATHAN, B. y SINGH, J. (1979). Purification and some properties of lipase from *Streptococcus faecalis*. *J. Food Sci.* 44, 1747-1751.
- CHAPMAN, G.H. (1945). The significance of sodium chloride in studies of *Staphylococci*. *J. Bacteriol.* 50, 201-203.
- CHAPMAN, H.R. y SHARPE, M.E. (1987). Microbiología del queso. En "Microbiología lactológica Vol II, microbiología de los productos lácteos". Ed. R.K. Robinson. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
- CHAVARRI, F.J., DE PAZ, M. y NÚÑEZ, M. (1988). Optimization of fermentation parameters for the production of concentrated starters from nonbitter *Streptococcus lactis* I.N.I.A. 12. *J. Food Sci.* 53, 1854-1857.
- CHIANESE, L., GARRO, G., ADDEO, F., LÓPEZ-GÁLVEZ, G. y RAMOS, M. (1993). Discovery of an ovine α_{s2} -casein variant. *J. Dairy Res.* 60 (4), 485-493.
- CHOISY, C., GUEGUEN, M., LENOIR, J., SCHMIDT, J.L. y TOURNEUR, C. (1990). Los fenómenos microbianos. En "El queso". Ed. A. Eck. Editorial Omega, S.A., Barcelona.
- CHURCH, F.C., PORTER, D.H., CATIGNANI, G.L. y SWAISGOOD, H.E. (1985). An o-phthaldialdehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical Biochemistry* 146, 343-348.
- CHURCH, F.C., SWAISGOOD, H.E., PORTER, D.H. y CATIGNANI, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66, 1219-1227.
- DEIANA, P., FATICHENTI, F., FARRIS, G.A., MOCQUOT, G., LODI, R., TODESCO, R. y CECCHI, L. (1984). Metabolization of lactic acid and acetic acids in Pecorino Romano cheese made with a combined starter of lactic acid bacteria and yeast. *Lait*, 64, 380-394.

- DE JONG, L. (1990). Nuevo cuajo estándar. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 3, 123-131.
- DELLAGLIO, F., ROISSART, H., TORRIANI, S., CURK, M.C. y JANSSENS, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En "Bactéries Lactiques. Vol I." Ed. H. Roissart y F.M. Luquet. Editorial Loriga. Uriage. Francia.
- DENIS, F., VEILLET, L. y MICHEL, M. (1988). Détermination des *Leuconostoc* dans les produits alimentaires: comparaison de milieux pour leur identification-microbiologie des légumes de la quatrième gamme. *Microbiol. Aliments Nutr.* 6, 185-192.
- DESMAZEAUD, M.J. (1991). Maîtrise des bactéries lactiques par la connaissance de leurs métabolismes. En "Les Bactéries Lactiques. Actes du colloque Lactic 91". pp 59-65. Centre de publications de L'Université de Caen.
- DESMAZEAUD, M.J. y ROISSART, H. (1994). Métabolisme general des bactéries lactique. En "Bactéries Lactiques. Vol I". Ed. Roissart, H. y Luquet, F.M. Editorial Lodice.
- DESMAZEAUD, M.J. y VASSAL, L. (1979). Characterization of proteolytic activities from mesophilic lactic acid bacteria and their role during cheese ripening. *Lait* 59, 327-344.
- DE VOS, W.M. y SIMMONS, G. (1988). Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic *Streptococci*: the phospho- β -galactosidase and β -galactosidase genes and their expression products. *Biochimie* 70, 461-473.
- DEVOYOD, J.J. y MULLER, M. (1969). La flore microbienne du fromage de Roquefort. I. Action des enterocoques vis-a vis des streptocoques lactiques et des leuconostoc. Influence de differents microorganisms de contamination. *Lait* 487, 369-399.
- DIRECTIVA 92/46/CE N° L 268/17 del 14 de septiembre de 1992. *D. O. Comunidades Europeas* 17-19.
- DIRECTIVA 94/71/CE N° L 368/33 del 31 de diciembre de 1994. *D. O. Comunidades Europeas* 33-37.
- DIVIES, C. (1991). Le métabolisme de l'acide citrique par les bactéries lactiques. En "Les Bactéries Lactiques. Actes du colloque Lactic 91". pp 103-119. Centre de publications de L'Université de Caen. Francia.
- DRUCE, R.G., BEBBINGTON, N.N., ELSON, K., HARCUMBE, J. M. y THOMAS, S.B. (1957). The determination of the *Coli-aerogenes* content of Milk and dairy equipment by plating in Violet Red Bile Agar incubated at 30 °C. *J. Appl. Bacteriol.* 20 (1), 1-10.
- EL ABOUDI, M., EL SODA, M., PANDIAN, S., SIMARD, R. y OLSON, N. (1992). Purification of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus casei* subspecies. *Int. J. Food Microbiol.* 15, 87-98.

- ELEY, A.R. (1992). Other bacterial pathogens. En "Microbial Food Poisoning". pp 57-73. Editorial Chapman and Hall. Londres.
- ELLIKER, P.R., ANDERSON, A.W. y HANNESSON, G. (1956). An agar culture medium for lactic acid *Streptococci* and *Lactobacilli*. *J. Dairy Sci.* 39,1611-1612.
- EL-SHAFEI, H., EL-SODA, H y EZZAT, N. (1990). The peptide hydrolase system of the *Leuconostoc*. *J. Food Protect.* 53 (2), 165-169.
- EL-SODA, M.A. (1993). The role of Lactic Acid Bacteria in accelerated cheese ripening. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 239-252.
- EL-SODA, M.A. y DESMAZEAUD, M.J. (1982). Les peptide-hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium*. I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Can. J. Microbiol.* 28, 1181-1188.
- EXTERKATE, F.A. (1984). Location of peptidases outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 177-183.
- EXTERKATE, F.A. y ALTING, A.C. (1995). The role of starter peptidases in the initial proteolytic events leading to amino acids in Gouda cheese. *Int. Dairy J.* 5, 15-28.
- EZZAT, N., EL SODA, M., DESMAZEAUD, M. y ISMAIL, A. (1986). Peptide hydrolases from the *Thermobacterium* group of *Lactobacilli*. III. Characterization of the intracellular exopeptidases. *Lait* 66, 445-451.
- FARKYE, N.Y. y FOX, P.F. (1990). Objectives indices of cheese ripening. *Trends Food Sci. Technol.* 1 (2), 37-40.
- FERNÁNDEZ DEL POZO, B., GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ MARÍN, M.A. y NÚÑEZ, M. (1988a). Changes in the microflora of La Serena ewes'cheese during ripening. *J. Dairy Res.* 55, 449-455.
- FERNÁNDEZ DEL POZO, B., GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ MARÍN, M.A. y NÚÑEZ, M. (1988b). Streptococci in sheep milk and in La Serena cheese. VI Reunión Científica de Microbiología de los Alimentos. Madrid. Resúmenes de Comunicaciones.
- FERNÁNDEZ DEL POZO, B., GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ MARÍN, M.A. y NÚÑEZ, M. (1989). El queso de la Serena: tecnología, química, reología y microbiología. *Rev. Esp. Lech.* 10, 32-34.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., ALCALA, M., MARCOS, A. y ESTEBAN M.A. (1987). Composición química y valor energético de algunas variedades de queso azul europeo. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 6 (1), 279-282.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., MARCOS, A., ALCALA, M. y ESTEBAN M.A. (1989). Proteolysis of Cabrales cheese and other European blue vein cheese varieties. *J. Dairy Res.* 56, 141-145.

- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., SANJUÁN, E. Y MONTERO, E. (1991). A Preliminary study of the chemical composition of Guía cheese. *J. Food Composition and Analysis* 4, 262-269.
- FORTECHA, J., PELÁEZ, C. y JUÁREZ, M. (1994). Biochemical characteristics of a semi-hard ewe's-milk cheese. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 198, 24-28.
- FORDYCE, A.M., CROWN, V.L. y THOMAS, T.D. (1984). Regulation and product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 332-337.
- FOX, P.F. (1989). Acceleration of cheese ripening. *Food Biotechnol.* 2 (2), 133-135.
- FOX, P.F., LUCEY, J.A. y COGAN, T.M. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Food Sci. Nutr.* 29 (4), 237-253.
- FOX, P.F. (1993). Cheese: an Overview. En "Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol I. General aspects (2ª edition)". Ed. P.F.Fox. Chapman and Hall. Londres.
- FOX, P.F., LAW, J., MC. SWEENEY, P.L.H. y WALLACE, J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. En "Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol I. General aspects (2ª edition)". Ed. P.F.Fox. Chapman and Hall, Londres.
- FRANKLIN, J.G. y SHARPE, M.E. (1963). The incidence of bacteria in cheese milk and Cheddar cheese and their association with flavour. *J. Dairy Res.* 30, 87-89.
- GARBELLI, S., NEVIANI, E., MUCHETTI, G. y CABRINI, A. (1984). Contributo allo studio delle microflora du formaggi di Valle Camonica. *L'industria del latte* 20 (3/4), 3-12.
- GARCÍA, M.C., OTERO, A., GARCÍA, M.L. y MORENO, B. (1987). Microbiological quality and composition of two types of spanish sheep's milk cheeses (Manchego and Burgos varieties). *J. Dairy Res.* 54, 551-557.
- GARCÍA DE FERNANDO, G.D., SANZ, B., ASENSIO, M.A. y ORDÓÑEZ, J.A. (1992). Effect of extracellular proteinase of *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* on protein breakdown in cheese. *Milchwiss.* 47 (7), 420-422.
- GARCIRIAIN, R. (1995). Evolución del pH durante la elaboración del queso Roncal. Trabajo fin de carrera de Ingeniero Técnico Agrícola. Universidad Pública de Navarra. España.
- GARVIE, E.I. (1960). The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.* 27, 283-292.
- GARVIE, E.I. (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostoc* from other Lactic Acid Bacteria. En "Methods in Microbiology" 16, 147-177. Academic Press. Londres.

- GARVIE, E.I. (1986). Genus *Leuconostoc*. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2". pp 1071-1075. Ed. P. Sneath, N. Mair, E. Sharpe y J. Holt. Williams y Wilkins. Londres.
- GATTI, M., BORIO, P., FORNASARI, E. y NEVIANI, E. (1993). Microflora casearia *Enterococci* nei formaggi italiani. *Latte* 18 (4), 392-397.
- GAYA, P. y BAUTISTA, L. (1989). Mejora de la calidad higiénico-sanitaria de quesos de leche cruda. *Ovis* 2, 59-65.
- GAYA, P., MEDINA, M. y NÚÑEZ, M. (1983). Accelerated decrease of enterobacteriaceae counts during ripening of raw milk Manchego cheese by lactic culture inoculation. *J. Food Protect.* 46, 305-308.
- GAYA, P., MEDINA, M. y NÚÑEZ, M. (1986). Mejora de la calidad higiénico-sanitaria del queso Manchego mediante la optimización de los parámetros de elaboración. *Rev. Esp. Lech.* 8, 31-34.
- GAYA, P., MEDINA, M. y NÚÑEZ, M. (1987). *Enterobacteriaceae*, coliforms, faecal coliforms and *Salmonella* in raw ewes' milk. *J. Appl. Bacteriol.* 62, 321-326.
- GEIS, A., KIEFER, B y TENBER, M. (1986). Proteolytic activities of Lactic Acid *Streptococci* isolated from dairy starter cultures. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 10, 93-95.
- GIBSON, T. y ABD -EL MALEK, Y. (1945). The formation of CO₂ by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformes* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.* 14, 35-44.
- GIORI, G.S., VALDEZ, G.F., RUIZ HOLGADO, A.P. y OLIVER, G. (1985). Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 68, 2160-2164.
- GIREAUD-GALZY, P. (1985). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Collection Génie Alimentaire. Editorial de L'Usine. Francia.
- GOIKOETXEA, C. (1993). Leche de oveja Latxa: control y variaciones de composición durante las campañas 1991 y 1992. Trabajo fin de carrera de Ingeniero Técnico Agrícola. Universidad Pública de Navarra. España.
- GÓMEZ, R. y PELÁEZ, C. (1989). Fermentos lácticos en la industria quesera. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 1, 193-202.
- GÓMEZ, R. y PELÁEZ, C. (1990). Bioprocesos en la industria láctea. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 30 (2), 163-173.
- GONZÁLEZ-CRESPO, J. y MAS, M. (1993). Estudio del empleo de fermentos iniciadores autóctonos en la elaboración del queso de cabra de pasta prensada, con leche pasteurizada. *Alimentaria* 243, 51-53.

- GONZÁLEZ-CRESPO, J., MAS, M. y LÓPEZ, F. (1990). Efecto de la tecnología de elaboración y la temperatura de maduración en las características del queso de La Serena. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 30 (3), 356-362.
- GONZÁLEZ DE LLANO, D. y RAMOS, M. (1989). Composición química de la leche de oveja. *Ovis* 2, 9-19.
- GONZÁLEZ DE LLANO, D., RAMOS, M., RODRÍGUEZ, A., MONTILLA, A. y JUÁREZ, M. (1992). Microbiological and physicochemical characteristics of Gamonedo Blue cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 2, 121-135.
- GRIFFITH, R. y HAMMOND, E.G. (1989). Generation of Swiss cheese flavor components by the reaction of aminoacids with carbonyl compounds. *J. Dairy. Sci.* 72, 604-613.
- GRIPON J. C., MONNET, V., LAMBERET, G. y DESMAZEAUD, M.J. (1991) Microbial enzymes in cheese ripening. En "Food Enzymology. Vol 1". pp 131-168. Ed. P.F. Fox. Elsevier Science Publishers. Londres.
- GROSS, K.C., HOUGHTON, M.P. y SENTERFIT, L.B. (1975). Presuntive specialitation of *Streptococcus bovis* and other group D *Streptococci* from human sources by using arginine and pyruvate tests. *J. Clinical Microbiol.* 54-60.
- GUINDEO, M.J., ASTIASARÁN, I. y BELLO, J. (1990). Estudio del proceso de maduración del queso "Urbasa" elaborado de modo artesanal con leche de oveja de raza Lacha. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 30 (4), 469-478.
- GUINEE, T. Y FOX, P.F. (1987). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects En "Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol 1". Ed. P.F. Fox. Elsevier Applied Science. Londres.
- HAGRASS, A.E.A., FAYED, E.O., ALY, A.A. y EL-SAMRAGY, Y.A. (1991). Growth characteristics of enterococci isolated from Laban Rayeb. *Die Nahrung* 35, 209-213.
- HARRIGAN, W.F. y MCCANCE, M.E. (1979). Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. Editorial Academia. España.
- HARVEY, W.R. (1987). User's guide for LSMLMW PC-1 Version.
- HAYES, P.R. (1992). Food Microbiology and Hygiene. 2ª edición. Editorial Elsevier. Applied Science. Londres.
- HEGAZI, F.Z. (1989). Some properties of white pickled cheese made with *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* as a starter. *Die Nahrung* 8, 721-728.
- HEGAZI, F.Z. (1990a). Growth rate, proteolysis and acid production of *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* in skim milk with some additives. *Die Nahrung* 34, 195-199.

- HEGAZI, F.Z. (1990b). Extracellular proteinase of *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*: production - milk - clotting and proteolytic activities. *Microbiol. Alimentos Nutr.* 8, 341-348.
- HEGAZI, F.Z. y ABO-ELNAGA, I.G. (1987). Proteolytic activity of crude cell-free extract of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Die Nahrung* 31, 225-232.
- HEGAZI, F.Z. y ABO-ELNAGA, I.G. (1990). Dissimilation of organic acids by dairy lactic acid bacteria. *Die Nahrung* 34 (9), 791-801.
- HERNÁNDEZ, M., BARNETO, R. y GARRIDO, M.P. (1989). Microbiología del queso Gamonedo. *Alimentaria* 205, 47-50.
- HERNÁNDEZ HABA, J. y DUBÓN, F. (1992 a). En "Sistemática bacteriana, 3ª edición" 12, 26-28.
- HERNÁNDEZ HABA, J. y DUBÓN, F. (1992 b). En "Sistemática bacteriana, 3ª edición" 12, 29-30.
- HERNÁNDEZ HABA, J. y DUBÓN, F. (1992 c). En "Sistemática bacteriana, 3ª edición" 12, 31-32.
- HERNÁNDEZ HABA, J. y DUBÓN, F. (1992 d). En "Sistemática bacteriana, 3ª edición" 14, 2-6.
- HICKEY, M.W., HILLIER, A.J. y JAGO, G.R. (1986). Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 825-831.
- HILL, S.H. y GASSON, M.J. (1986). A qualitative screening procedure for the detection of casein hydrolysis by bacteria, using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* 53, 625-629.
- HUALDE J.M., PAGOLA, J. y TORRE, P. (1989). Quesos de Navarra. Publicaciones del Gobierno de Navarra, Departamento de Presidencia e Interior. Pamplona.
- HURST, S. y COLLINS-THOMPSON, D.L. (1979). Food as a bacterial habitat. En "Advances in microbial ecology. Vol 3". Ed. M. Alexander. Plenum press, Nueva York.
- IBÁÑEZ, F.C. (1994). Influencia de los procesos de salado y ahumado sobre las características fisicoquímicas del queso Idiazábal (compuestos nitrogenados). Tesis doctoral 23. Departamento de Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco. Vitoria.
- IBÁÑEZ, F.C., TORRES, M.I., PÉREZ-ELORTONDO, F.J. y BARCINA, Y. (1993). Physicochemical changes during ripening of Idiazábal cheese induced by brining time. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 15 (3/4), 79-83.
- I.C.M.S.F. (1982). Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos. En "Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico". Editorial Acribia. Zaragoza.

- IÑIGO, B., MARTÍN, D., BARNETO, R., QUINTANA, M.A., GARRIDO, M.P., BURDASPAL, P. y BRAVO, F. (1986). Histaminogénesis en quesos: I. Cambios en la microflora y en el contenido de histamina durante la maduración. *Alimentaria* 177, 33, 35-38.
- JAY, J.M. (1994). Indicadores de la calidad y de la inocuidad microbiológicas de los alimentos. En "Microbiología moderna de los alimentos". pp 497-503. Editorial Acribia. Zaragoza.
- JENSEN, J.P., REINBOLD, G.W., WASHAM, C.J. y VEDAMUTHU, E.R. (1975). Role of *Enterococci* in Cheddar cheese: proteolytic activity and lactic acid development. *J. Milk Food Technol.* 38 (1), 3-7.
- JOHNSON, S.L. (1984). Bacterial classification III. Nucleic acids en bacterial classification. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. I". pp 8-11. Ed. N.R. Krieg y J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore.
- JORDAN, K.N. y COGAN, T.M. (1993). Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Ir. J. Agric. Food Res.* 32 (1), 47-55.
- JUÁREZ, M., MARTÍNEZ-CASTRO, J., RAMOS, M., MÉNDEZ, A. y MARTÍN-ALVAREZ, P. (1978). Estudio sobre la composición de la leche de vaca en España. Edita Instituto de Productos Lácteos, C.S.I.C. Madrid.
- JUÁREZ, M., RAMOS, M., GOICOECHEA, A. y JIMÉNEZ-PÉREZ, S. (1984). Main components, nitrogen and mineral elements of Manchego ewes'milk. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 8, 143-146.
- KAISER, H.F. (1960). The application of electronic computers to factor analysis. *Educational and Psychological Measurement* 20, 141-151.
- KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU, E. y MANOLOPOULOU, E. (1990). Proteinase, peptidase and esterase activities of cell-free extracts from wild strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from traditional Greek yogurt. *J. Dairy Res.* 57, 593-601.
- KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D., TZANETAKIS, N. y LITOPOULOU-TZANETAKI, E. (1994). Microbiological and physicochemical characteristics of "Anthotyro", a Greek traditional whey cheese. *Food Microbiol.* 11, 15-19.
- KAMALY, K.M. y MARTH, E.H. (1988). Proteinase and peptidase activities of cell-free extracts from mutant strains of lactic streptococci. *J. Dairy Sci.* 71, 2349-2357.
- KAMALY, K.M. y MARTH, E.H. (1989). Enzyme activities of Lactic *Streptococci* and their role in maturation of cheese: A review. *J. Dairy Sci.* 72, 1945-1966.
- KAMINOGAWA, S. y YAMAUCHI, K. (1972). Acid protease of bovine milk. *Agric. Biol. Chem.* 36, 2351-2356.
- KAMINOGAWA, S., YAN, T.R., AZUMA, N. y YAMAUCHI, K. (1986). Identification of low molecular peptides in Gouda-type cheese and evidence for the formation of these peptides from 23 N-

terminal residues of as1-casein by proteinases of *Streptococcus cremoris* H61. *J. Food Sci.* 51 (5), 1253-1256.

KANDLER, O. y WEISS, N. (1986). Regular non sporing Gram-positive rods. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2". pp 1208-1260. Ed. P. Sneath, N. Mair, E. Sharpe y J. Holt. Williams y Wilkins. Londres.

KEMPLER, G.M. y MCKLAY, L.L. (1979). Characterization of plasmid desoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 316-326.

KENNER, B.A., CLARK, H. F. y KABLER, P.W. (1961). Faecal *Streptococci*. I. Cultivation and enumeration of *streptococci* in surface waters. *Appl. Microbiol.* 9, 15-18.

KERSTERS, K. y POT, B. (1991). Classification and identification methods for lactic acid bacteria with emphasis on protein gel electrophoresis. En "Les bactéries lactiques. Actes du colloque Lactic 91". Centre de publications de L'Université de Caen. Francia.

KHALID, N.M. y MARTH, E.H. (1990a). Lactobacilli-their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. *J. Dairy Sci.* 73, 2669-2684.

KHALID, N.M. y MARTH, E.H. (1990b). Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* 73, 3068-3076.

KHALID, N.M. y MARTH, E.H. (1990c). Partial purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Syst. Appl. Microbiol.* 13, 311-319.

KILPPER-BÄLZ, R. y SCHLEIFER, K.H. (1984). Nucleic acid hybridization and cell wall composition studies of pyogenic *Streptococci*. *FEMS Microbiol. Lett.* 10, 355-364.

KOK, J. (1993). Symposium: Microbiology of cheese flavor development. *J. Dairy Sci.* 76, 2056-2064.

KUNZ, B. (1986). Empleo de los cultivos de microorganismos. En "Cultivo de microorganismos para la producción de alimentos. Obtención, aplicaciones e investigación". pp 61-91. Editorial Acibia. Zaragoza.

LALOUX, J. (1986). La détermination des spores butyriques dans le lait cru destiné à la fromagerie. *Revue de l'Agriculture* 2, (39), 387-397.

LANE, D.J., PACE, B., OLSEN, G.J., STAHL, D.A., SOGIN, M.L. y PACE, N.R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82, 6955-6959.

LANE, D.L., FIELD, K.G., OLSE, G.J. y PACE, N.R. (1988). Reverse transcriptase sequencing of ribosomal ARN for phylogenetic analysis. *Methods Enzymol.* 167, 138-144.

- LAU, K.Y., BARBANO, D.M. y RASMUSSEN, R.R. (1991). Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 74, 727-740.
- LAW, B.A., SEZGIN, E. y SHARPE, M.E. (1976). Aminoacid nutrition of some commercial cheese starters in relation to their growth in peptone-supplemented whey media. *J. Dairy Res.* 43, 291-300.
- LAW, B.A. y KOLSTAD, J. (1983). Proteolytic Systems in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49, 225-245.
- LAWRENCE, R.L., THOMAS, T.D. y TERZAGHI, B.E. (1976). Reviews of the progress of Dairy Science: Cheese starters. *J. Dairy Res.* 43, 141-193.
- LENOIR, J., LAMBERET, G., SCHMIDT, J.L. y TOURNEUR, C. (1985). Le maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofutur* diciembre, 23-50.
- LITOPOULOU-TZANETAKI, E., TZANETAKIS, N. y VAFOPOULOU-MASTROJIRANNAKI, A. (1993). Effect of the type of starter on microbiological chemical and sensory characteristics of Feta cheese. *Food Microbiol.* 10, 31-41.
- LODICS, T.A. y STEENSON, L. (1990). Characterization of bacteriophages and bacteria indigenous to a mixed-strain cheese starter. *J. Dairy Sci.* 73, 2685-2696.
- LÓPEZ-FANDIÑO, R. (1992). Proteolisis de las caseínas y su incidencia en la tecnología de productos lácteos. Ed. Fundación de Estudios Lácteos. Serie Tesis Doctorales. Nº 1. Madrid.
- LOWRIE, R.J., LAWRENCE, R.C., PEARCE, L.E. y RICHARDS, E.L. (1972). Cheddar cheese flavour. III. The growth of Lactic Streptococci during cheesemaking and the effect on bitterness development. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 7, 44-49.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275.
- LUCEY, J.A. y FOX, P.F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. *J. Dairy Sci.* 76 (6), 1714-1724.
- LUDWIG, W., SEEWALDT, E., KILPPER-BÄLZ, R., SCHLEIFER, K.H., MAGRAM, L., WOESE, C.R., FOX, G.E. y STACKEBRANDT, E. (1985). The phylogenetic position of Streptococcus and Enterococcus. *J. Gen. Microbiol.* 131, 543-551.
- MACEDO, A.C., MALCATA, F.X. y OLIVEIRA, J.C. (1993). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *J. Dairy Sci.* 70, 1725-1739.
- MAN, J.C., ROGOSA, M. y SHARPE, M.E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135.
- MARTÍNEZ MANSO, P. y FERNÁNDEZ SALGUERÓ, J. (1978). Estudio de algunas floras microbianas del queso de la Serena. *Arch. Zootec.* 27 (105), 93-97.

- MARTÍNEZ MORENO, J.L. (1976). Flora microbiana del queso Manchego. III. Estreptococos. *An. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Gen.* 4, 41-56.
- MARTÍNEZ MORENO, J.L. y NÚÑEZ, M. (1976). Flora microbiana del queso Manchego. II. Evolución de la flora microbiana de quesos manchegos industriales. *An. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Gen.* 4, 33-41.
- MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. y COLLINS, M.D. (1990). A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 70, 73-84.
- MARTLEY, F.G. y CROW, V.L. (1993). Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int. Dairy J.* 3, 461-483.
- MARTLEY, F.G. y LAWRENCE, R.C. (1972). Cheddar cheese flavour. II. Characteristics of single strain starters associated with good or poor flavour development. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 7, 38-44.
- MAS, M. y GONZÁLEZ-CRESPO J. (1992). Bacterias lácticas en el queso de los Ibores. *Alimentaria* 92, 41-43.
- MASSA, S., CARUSO, M., GALGANO, F., ROSI, I. y SINIGAGLIA, M. (1994). A survey on bacteriological and chemical characteristics in Pecorino cheese manufactured in the Basilicata area (Italy). *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 15 (3/4), 136-140.
- MASSÓ, J. (1974). Tipificación y características del queso Manchego. *Alimentaria* 11 (57), 73-75,77.
- MAYEUX, J.V., SANDINE, W.E. y ELLIKER, P.R. (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starters cultures. *J. Dairy Sci.* 45, 655-656.
- MÄYRÄ-MÄKINEN, A. y BIGRET, M. (1993). Industrial use and production of Lactic Acid Bacteria. En "Lactic Acid Bacteria". Ed. S. Salminen y A. Von Wrigh. Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
- MCFADDIN, J.F. (1990). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Panamericana. México.
- MCKAY, L.L. (1983). Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49, 225-245.
- MCPMAHON, J., BROWN, R.J. y ERNSTROM, C.A. (1984). Enzymatic coagulation of milk casein micelles. *J. Dairy Sci.* 67, 745-748.
- MCSWEENEY, P.L.H. y FOX, P.F. (1993). Cheese methods of chemical analysis. En "Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol 1". pp 341-388. Ed. P.F. Fox. Editorial Chapman and Hall.

- MCSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F., LUCEY, J.A., JORDAN, K.N. y COGAN, T.M. (1993). Contribution of the indigenous microflora to maturation of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 3, 613-634.
- MEDINA, M., FERNÁNDEZ DEL POZO, B.S. y NÚÑEZ, M. (1989). Quesos españoles artesanales de leche de oveja. *Ovis* 2, 34-39.
- MEDINA, M., FERNÁNDEZ DEL POZO, B.S., RODRÍGUEZ-MARÍN, A. GAYA, P. y NÚÑEZ, M. (1991). Effect of lactic starter inoculation on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena Cheese. *J. Dairy Res.* 58, 355-361.
- MIETTON, B., DESMAZEAUD, M., ROISSART, H. y WEBER, F. (1994). Transformation du lait en fromage. En "Bactéries Lactiques. Vol II." Ed. H. Roissart y F.M. Luquet. Editorial Loriga. Uriage. Francia.
- MILLAN, R., ALCALA, M., SANJUAN, E., PENEDO, J.C. y CASTELO, M. (1991). Componentes fisicoquímicos y nitrogenados del queso Idiazábal. *Microbiol. Alimentos. Nutr.* 9, 299-303.
- MILLAN, R., ALCALA, M., SANJUAN, E., PENEDO, J.C. y CASTELO, M. (1992). Componentes fisicoquímicos y nitrogenados del queso del Roncal. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 6, 51-64.
- MILLER, L.T. (1984). Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids as a bacterial identification aid. *Hewlett-Packard Application Note* 228, 37.
- MILLIERE, J.B., MATHOT, A.G., SCHMITT, P. y DIVIES, C. (1989). Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 529-542.
- MIRANDA, G. y GRIPON, J.C. (1986). Origine, nature et incidences technologiques de la protéolyse dans le lait. *Lait* 66, 1-18.
- MIYAKAWA, H., KOBAYASHI, S., SHIMAMURA, S. y TOMITA, M. (1991). Purification and characterization of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBU-147. *J. Dairy Sci.* 74, 2375-2381.
- MONNET, V. y GRIPON, J.C. (1994). Métabolisme azoté des bactéries lactiques En "Les Bactéries Lactiques . Vol I". Ed. H. Roissart y F.M. Luquet. Editorial Lodice. Uriage. Francia.
- MONNET, V., CHAPOT-CHARTIER, M.P. y GRIPON, J. C. (1993). Les peptidases des lactocoques. *Lait* 73, 97-108.
- MONNET, V., LE BARS, D., NEVIANI, E. y GRIPON J.C. (1987). Partial characterization and comparison of cell wall proteinases from 5 strains of *Streptococcus lactis*. *Lait* 67 (1), 51-61.
- MOSSEL, D.A.A. (1987). Los análisis microbiológicos de los alimentos. *Alimentaria* 188, 17-26.
- MOSSEL, D.A.A., EELDERINK, I., KOOPMANS, M. y VAN ROSSEM, F. (1978). Optimisation of a McConkey-type medium for the enumeration of *Enterobacteriaceae*. *Lab. Practice* 27 (12), 1049-1050.

- MOSSEL, D.A.A., KLEYNEN-SEMMEILING, A.M.C., VINCENTIE, H.M., BEERENS, H. y CATSARAS, M. (1970). Oxytetracycline-glucose-yeast extract agar for selective enumeration of moulds and yeast in foods and clinical material. *J. Appl. Bacteriol.* 33, 454-457.
- MUNDT, J.O. (1973). Litmus milk reaction as a distinguishing feature between *Streptococcus faecalis* y human and nonhuman origins. *J. Milk Food Technol.* 36, 364-367.
- MUNDT, J.O. (1976). Streptococci in dried and frozen foods. *J. Milk Food Technol.* 36 (6), 413-416.
- MUNDT, J.O. (1982). The ecology of the Streptococci. *Microbiol. Ecol.* 8, 355-369.
- MUNDT, J.O (1986). *Enterococci*. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2". pp 1063-1066. Ed. P. Sneath, N. Mair, E. Sharpe y J. Holt. Williams y Wilkins. Londres.
- NARVHUS, J.A., HULLBAEKDAL, A. y ABRAHAMSEN, R.K. (1993). Occurrence of lactobacilli and leuconostoc in norwegian cheese of Gouda type and their possible influence on cheese ripening and quality. *Int. Dairy J.* 3 (4-6), 566.
- NEVIANI, E., BOQUIEN, C.Y., MONNET, V., THANH, L. y GRIPON, J.C. (1989). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (9), 2308-2314.
- NEVIANI, E., MUCHETTI, G., CONTARINI, G. y CARINI, S. (1982). Ruolo delle *Enterococcaceae* nei formaggi italiani. I. Loro presenza in formaggi di monte ed impiego in un innesto selezionato. *Latte* 7, 722-728.
- NORMA FIL - IDF 4 (1958). (1986). Determinación del extracto seco en queso. En "Métodos oficiales de análisis. Tomo I". Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- NORMA FIL 105 (1981). (1986). Determinación del contenido en grasa. Butirómetros Gerber. En "Métodos oficiales de análisis. Tomo I". Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- NORMA ISO 33433 - 1975. (1986). Determinación del contenido en grasa. Método Van Gulick. En "Métodos oficiales de análisis. Tomo I". Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- NORMA NF V04-204 (1969). (1986). Determinación de la masa volúmica (método usual). En "Contrôle de la qualité des produits laitiers". Recueil de Normes Françaises 3^e édition. Ed. Association Française de Normalisation. ITSV. Douai Cedex. Francia.
- NOUSIAINE, J. y SETÄLÄ, J. (1993). Lactic acid bacteria as animal probiotics. En "Lactic Acid Bacteria" pp 315-357. Ed. S. Salminen y A. Von Wrigh. Editorial Marcel Dekker. Nueva York.
- NÚÑEZ, M. (1976a). Flora microbiana del queso Manchego. IV. Lactobacilos. *An. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Gen.* 4, 57-65.

- NÚÑEZ, M. (1976b). Flora microbiana del queso Manchego. V. *Leuconostoc*. *An. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Gen.* 4, 67-74.
- NÚÑEZ, M. (1976c). Flora microbiana del queso Manchego. VI. *Pediococos*. *An. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Gen.* 4, 75-81.
- NÚÑEZ, M. (1978). Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. *J. Dairy Res.* 45, 501-508.
- NÚÑEZ, M. (1985). Los fermentos lácticos y su influencia sobre los distintos quesos. *Rev. Esp. Lech.* 6, 46-52.
- NÚÑEZ, J.A., CHAVARRI, F.J. y NÚÑEZ, M. (1984). Psychrotrophic bacterial flora of raw ewes'milk, with particular reference to Gram negative rods. *J. Appl. Bacteriol.* 57, 23-29.
- NÚÑEZ, M. y MARTÍNEZ MORENO, J.L. (1976). Flora microbiana del queso Manchego. I. Evolución de la flora microbiana de quesos manchegos artesanales. *An. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Gen.* 4, 11-31.
- NÚÑEZ, M., MARTÍNEZ MORENO, J.L. y MEDINA, A.L. (1981). Ensayo de cepas de *Streptococcus lactis* de diversa actividad acidificante como fermentos para queso de tipo Manchego. *An. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Gan.* 12, 65-72.
- NÚÑEZ, M. y MEDINA, M. (1979). La flore lactique du fromage bleu de Cabrales. *Lait* 588, 497-513.
- NÚÑEZ, M., MEDINA, M. y GAYA, P. (1989). Ewes'milk cheese: technology, microbiology and chemistry. *J. Dairy Res.* 56, 303-321.
- OVERBERG, C.J., MERRILL, R.K., MOYES, L.V., BROWN, R.J. y RICHARDSON, G.H. (1991). Effects of *Lactobacillus helveticus* culture on physical properties of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 74, 4101-4107.
- OLIVARES, J.C., RUA, B. SUSAEITA, I. y ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA, P. (1993). Growth kinetics of several lactic bacteria useful as starter for ewe's cheese production. *Biotechnol. Lett.* 15 (10), 1071-1076.
- OLSON, J.C. y MOCQUOT, G. (1984). Leche y Productos Lácteos. En "Ecología Microbiana de los Alimentos". pp 472-525. Editorial Acribia. Zaragoza.
- ORDÓÑEZ, J.A., BARNETO, R. y MÁRMOL, M.P. (1978a). Identificación de la flora que participa en la maduración del queso Manchego. *An. Bromatol.* XXX-3-4, 361-363.
- ORDÓÑEZ, J.A., BARNETO, R. y MARMOL, M.P. (1978b). Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwiss.* 33 (190), 609-613.
- ORDÓÑEZ, J.A., MASSO, J.A., MÁRMOL, M.P. y RAMOS, M. (1980). Contribution a l'étude du fromage Roncal. *Lait* 60, 283-294.

- ORDÓÑEZ, S.A., SELGAS, M.D., GARCÍA, M.L. y SANZ, B. (1988). Grupos microbianos de interés lactológico. *Rev. Esp. Lech.* 3, 30-35.
- ORIA, R. y SALA, F.J. (1992). Aspectos bioquímicos del proceso madurativo del queso "Roncal". Monografía de Príncipe de Viana. Departamento de Educación y Cultura. Gobierno de Navarra. Año XI-XII. Nº 11-12, 293-313.
- ORLA JENSEN, S. (1919). The Lactic Acid Bacteria. *Mem. Acad. Royal Soc. Denmark Ser.* 8 5, 81-197. Host. Copenhagen.
- ORVIN, J.L. (1986 a). *Enterococci*. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2". pp 1063-1065. Ed. P. Sneath, N. Mair, E. Sharpe y J. Holt. Williams y Wilkins. Londres.
- ORVIN, J.L. (1986 b). Lactic Acid *Streptococci*. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2". pp 1065-1066. Ed. P. Sneath, N. Mair, E. Sharpe y J. Holt. Williams y Wilkins. Londres.
- PASCUAL, M.R. (1992). Investigación de estreptococos fecales. En "Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas". pp 91-97. Editorial Diaz de Santos. Madrid.
- PÉREZ-ELORTONDO, F.J., ALBISU, M. y BARCINA, Y. (1993a). Changes in the microflora of Idiazábal cheese with the addition of commercial lactic starters. *Aus. J. Dairy Technol.* 48, 10-14.
- PÉREZ-ELORTONDO, F.J., ALBISU, M., BARRON, L.J.R. y BARCINA, Y. (1993b). Microbiological changes with brining time and smoking during the ripening of Idiazábal cheese. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 15 (1/2), 14-20.
- PETERSON, S.D., MARSHALL, R.T. y HEYMANN, H. (1990). Peptidase profiling of Lactobacilli associated with Cheddar cheese and its application to identification and selection of strains for cheese-ripening studies. *J. Dairy Sci.* 73, 1454-1464.
- POULLET, B. (1991). Evolución de la flora microbiana del queso del Casar: identificación y preparación de cultivos iniciadores. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- POULLET, B., HUERTAS, M., SÁNCHEZ, A., CÁCERES, P. y LARRIBA, G. (1991). Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. *J. Dairy Res.* 58, 231-238.
- POULLET, B., HUERTAS, M., SÁNCHEZ, A., CÁCERES, P. y LARRIBA, G. (1993). Main Lactic Acid Bacteria isolated during ripening of Casar de Cáceres cheese. *J. Dairy Res.* 60, 123-127.
- PRATO, O.S. y MESSINA, G. (1990). En "Il: Provolone e altre paste filate". Instituto Sperimentale Lattiero Caseario. Editorial Lodi. Italia.
- PREMI, L., SANDINE, W.E. y ELLIKER, P.R. (1972). Lactose hydrolysing enzymes of Lactobacillus species. *Appl. Microbiol.* 24, 51-57.

- PRITCHARD, G.G. y COOLBEAR, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 179-206.
- PRITCHARD, G., FEEBAIRN, A.D. y COOLBEAR, T. (1994). Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK 11. *Microbiolog.* 140, 923-930.
- PROST, F. y CHAMBA, J.F. (1994). Effect of aminopeptidase activity of thermophilic lactobacilli of Emmental cheese characteristics. *J. Dairy Sci.* 77, 24-33.
- QUIST, K.B., THOMSEN, D. y HOIER, E. (1987). Effect of ultrafiltered milk and use of different starters on the manufacture, fermentation and ripening of Havarti cheese. *J. Dairy Res.* 54, 437-446.
- RAMET, J.P., CHOISY, C. y CHOPIN, M.C. (1990). Los agentes de la transformación de la leche. En "El queso". pp 95-114. Ed. A. Eck. Editorial Omega, S.A., Barcelona.
- RAMOS, M., BARNETO, R. y ORDÓÑEZ, J.A. (1981). Evaluation of a specific starter for Manchego cheese production. *Milchwiss.* 36 (9), 528-531.
- RAMOS, M., BARNETO, R., SUÁREZ, J.A. e IÑIGO, B. (1982). Contribution to study of Mahon cheese. I. Microbiological and biochemical aspects. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 7, 167-172.
- REITER, B. y SHARPE, M.E. (1971). Relationship of the microflora to the flavour of Cheddar cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 34 (11), 63-80.
- REQUENA, T., DE LA FUENTE, M.A., FERNÁNDEZ DE PALENCIA, P. JUÁREZ, M. y PELÁEZ C. (1992). Evaluation of a specific starter for the production of semi-hard goat's milk cheese. *Lait* 72, 437-448.
- REQUENA, T., PELÁEZ, C. y DESMAZEAUD, M.J. (1991). Characterization of *Lactococci* and *Lactobacilli* isolated from semihard goat's cheese. *J. Dairy Res.* 58, 137-145.
- REQUENA, T. PELÁEZ, C. y FOX, P.F. (1993). Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*. *Z. Lebensm Unters Forsch* 196, 351-355.
- ROCABAYERA, X. (1991). Manipulación de microorganismos a escala industrial y flora láctica en particular. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 1, 265-273.
- RODRÍGUEZ, L., BARCINA, Y. y RINCÓN, F. (1988). Contribución al estudio de tipificación del queso Idiazábal. *Alimentaria* 196, 57-59.
- ROGOSA, M., MITCHELL, J. A. y WISIMANN, R.F. (1951). A selective medium for the isolation of oral and faecal *Lactobacilli*. *J. Bacteriol.* 62, 132-133.

- RUA, B., OLIVARES, J.C., ROMERO, J.R. y ALDÁMIZ-ECHEBARRÍA, P. (1993). Diseño de un cultivo iniciador para queso Idiazábal: identificación de la flora láctica. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 6, 53-56.
- RUIZ ÍÑIGUEZ, J., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., ESTEBAN, M.A. y MARCOS, A. (1984). Principales parámetros que definen la composición química del queso Torta del Casar. *Arch. Zootec.* 33 (127), 301-312.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. y ERLICH, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Sc.* 239, 487-494.
- SANZ PÉREZ, B., LÓPEZ LORENZO, P., GARCÍA, M.L., HERNÁNDEZ, P.E. y ORDÓÑEZ, J.A. (1982). Heat resistance of enterococci. *Milchwiss.* 37 (12), 724-726.
- SCARPELLINO, R. y KOSIKOWSKI, F.V. (1962). Evolution of volatile compounds in ripening raw and pasteurized milk Cheddar cheese observed by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 45, 343-348.
- SCHLEIFER, K.H. (1987). Recent changes in the taxonomy of Lactic Acid Bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 46, 201-203.
- SCHLEIFER, K.H. y KILPPER-BÄLZ, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as. *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Systematic Bacteriol.* 34 (1), 31-34.
- SCHLEIFER, K.H., KRAUS, J., DEVORAK, C., KILPPER-BÄLZ, R., COLLINS, M.D. y FISCHER, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 6, 183-195.
- SCHMIDT, J.L., TOURNEUR, C. y LENOIR, J. (1994). Functions et choix des bactéries lactiques en technologies laitières. En "Les Bactéries Lactiques. Vol II". pp 37-55. Ed. H. Roissart y F.M. Luquet. Editorial Lodice. Uriage. Francia.
- SHAHANI, K.M., HARPER, W.J., JENSEN, R.G., PARRY, R.M. y ZITTLE, C.A. (1973). Enzymes in bovine milk: a review. *J. Dairy Sci.* 56, 531-543.
- SHANKAR, P.A. (1977). Interrelationships of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt culture. Tesis, University of Reading.
- SHARPE, M.E. (1962). Taxonomy of the *Lactobacilli*. *Dairy Sci. Abstr.* 24, 109-118.
- SHARPE, M.E. (1979). Identification of the Lactic Acid Bacteria. En "Identification Methods for Microbiologists, 2nd edition". Soc. Appl. Bacteriol. Technical Series, No.14, 2ª edition". Ed. F.A. Skinner y D.W. Lovelock. Academic Press. Londres.

- SILLA, M.H. (1989). Bacterias ácido lácticas: iniciadores fermentativos en productos cárnicos. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 29, 1-14.
- SIMARD, R.E. y LEMIEUX, L. (1992). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification. Structure masking and inhibition. *Lait* 72, 335-382.
- SIMMONS, J. S. (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes group and for isolation of certain fungi. *J. Infect. Dis.* 39, 209-211.
- SMID, E.J., POOLMAN, B. y KONINGS, W.N. (1991). Casein utilization by *Lactococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (9), 2447-2452.
- SPSS Inc. (1988). SPSS-X. User's guide. 3ª edición. Chicago: SPSS Inc.
- SRINIVAS, D., MITAL, B.K. y GARG, S.K. (1990). Utilization of sugars by *Lactobacillus acidophilus* strains. *Int. J. Food. Microbiol.* 10, 51-58.
- STADHOUDERS, J. (1975). Microbes in milk and dairy products. An ecological approach. *Neth. Milk Dairy J.* 29, 104-126.
- STADHOUDERS, J., HUP, G., EXTERTAKE, F.A. y VISSER, S. (1983). Bitter flavour in cheese. 1. Mechanism of formation of the bitter flavour defect in cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 37, 157-167.
- STANIER, R.Y., INGRAHAM, J.L., WHELIS, M.L. y PAINTER, P.R. (1991). Métodos de la microbiología. En "Microbiología, 2ª edición". pp 28. Editorial Reverté S.A. Barcelona.
- STEELE, J.L. y ÜNLÜ, G. (1993). Impact of Lactic Acid Bacteria on cheese flavour development. *Food Technol.* 46 (11), 128-135.
- SUÁREZ, J.A., BARNETO, R. e IÑIGO, B. (1983). Contribution to study of Mahon cheese. III. Lactic Acid Bacteria and *Enterococci*. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 8, 52-56.
- SUÁREZ, J.A., BARNETO, R. e IÑIGO, B. (1984a). Estudio microbiológico de la Torta del Casar. *Industrias Lacteas Españolas* 67, 25-29.
- SUÁREZ, J.A., BARNETO, R. e IÑIGO, B. (1984b). Contribution to study of Mahon cheese. IV. Selection of bacterial strains with technologically interesting characteristics. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 8, 147-150.
- TAMINE, A.Y. (1978). Microbiología de los cultivos iniciadores. En "Microbiología lactológica. Vol II. Microbiología de los productos lácteos". Ed. R.K. Robinson. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.
- TAN, P.S.T. y KONINGS, W.N. (1990). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (2), 526-532.
- TAN, P.S.T., POOLMAN, B. y KONINGS, W.N. (1993). The proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Res.* 60, 269-286.

- TER-KAZAR' YAN-SSH (1974). Proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Izv. Vissh. Uchev. Zaved. Pishch. Tekhnol.* 1, 67-69.
- TERZAGHI, B.E. y SANDINE, W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 29 (6), 807-813.
- THOMAS, T.D. y MILLS, O.E. (1981). Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* 35, 255-273.
- THOMPSON, T.L. y MARTH, E.H. (1986). Changes in Parmesan cheese during ripening: microflora-coliforms, enterococci, anaerobes, *propionibacteria* and *staphylococci*. *Milchwiss.* 41, 201-205.
- THOMSON, J. (1980). Galactose transport systems in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 144, 683-691.
- THUNELL, R.K., SANDINE, W.E. y BODYFELT, F.W. (1984). Defined strains and phage-insensitive mutants for commercial manufacture of Cottage cheese and cultured buttermilk. *J. Dairy Sci.* 67, 1175-1180.
- TRÉPANIÉ, G., SIMARD, R.E. y LEE, B.H. (1991). Effect of added Lactobacilli on composition and texture of Cheddar cheese during accelerated maturation. *J. Food Sci.* 56 (3), 696-700.
- TRÉPANIÉ, G., EL ABOUDI, M., LEE, B.H. y SIMARD, R.E. (1992). Accelerated maturation of Cheddar cheese: microbiology of cheeses supplemented with *Lactobacillus casei* subsp. *casei* L2A. *J. Food Sci.* 57 (2), 345-349.
- TROVATELLI, L.D., SCHIESSER, A. y MASSA, S. (1987). Identification and significance of enterococci in hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwiss.* 42 (11), 717-719.
- TSAKALIDOU, E., DALEZIOS, I., GEORGALAKI, M. y KALANTZOPOULOS, G. (1993). A comparative study: aminopeptidase activities from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* 76 (8), 2146-2151.
- TSAKALIDOU, E. y KALANTZOPOULOS, G. (1992a). Purification and partial characterization of an intracellular aminopeptidase from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* strain ACA-DC 114. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 227-232.
- TSAKALIDOU, E. y KALANTZOPOULOS, G. (1992b). Purification and partial characterization of an esterase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strain ACA -DC 127. *Lait* 72, 533-543.
- TSAKALIDOU, E., MANOLOPOULOU, E., TSILIBARI, V., GEORGALAKI, M. y KALANTZOPOULOS, G. (1993). Esterolytic activities of *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecium* strains isolated from Greek cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 47, 145-150.

- TURNER, K.W. y MARTLEY, F.G. (1983). Galactose fermentation and classification of thermophilic lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1932-1934.
- TZANETAKIS, N. y LITOPOULOU-TZANETAKI, E. (1992). Changes in numbers and kinds of Lactic Acid Bacteria in Feta and Teleme, two greek cheeses from ewe's milk. *J. Dairy Sci.* 75, 1389-1393.
- U. S. DEPT. HEALTH AND HUMAN SERV. (1980). Grade A pasteurized milk ordinance. No 017-001-00419-7. Gov. Printing Office. Washington, Dc:US.
- VADILLO, S., PAYA, M.J., CUTULI, M.T. y SUÁREZ, G. (1987). Raw milk mycoflora. *Milchwiss.* 42, 20-22.
- VAN DEN BERG, D.J.C., SMITS, A., POT, B., LEDEBOER, A.M., KERSTERS, K., VERBAKEL, J.M.A. y VERRIPS, T. (1993). Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnol.* 7 (3), 189-205.
- VANOS, V. (1991). Importance of streptococci group D in fermented dairy products, as indicators of quality assurance in comparison with coliforms. *Bolletín of the IDF* 264, 22-25.
- VARNAM, A.M. y EVANS, M.G. (1991). Foodborne pathogens. pp359-360. Editorial Wolfe Publishing LTD. Londres.
- VARNAM, A.M. y SUTHERLAND, J.P. (1994). Milk and milk products. Editorial Chapman and Hall. Londres.
- VEDAMUTHU, E.R. (1994). The dairy *Leuconostoc*: use in dairy products. *J. Dairy Sci.* 77, 2725-2737.
- VEINOGLU, B.C., BOYAZOGLU, E.S. y KOTOUZA, E.D. (1979). The effect of starters on the production of Feta cheese. *Dairy Ind. Int.* 44 (10), 29-33.
- VENEMA, G. (1993). Molecular biology and genetic modification of *Lactococci*. *J. Dairy Sci.* 76 (8), 2133-2144.
- VIEIRA DE SA, F., REIS MACHADO, B., RAFAEL PINTO, O.P., VICENTE DA CRUZ, I.M., DIAS CARNEIRO, M.J., ANTUNES BARBOSA, N.M. y COSTA REIS, M.M. (1970). Maturação em queijos de ovelha "Serra" e "Serpa". *Instituto Nacional de Investigação Industrial, Química i Biología* 6, 51-118.
- VISSER, F.M.W. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 3. Protein breakdown: analysis of the soluble nitrogen and aminoacid nitrogen fractions. *Neth. Milk Dairy J.* 31, 210-239.
- VISSER, S. (1993). Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor. An overview. *J. Dairy Sci.* 76, 329-350.

- VISSER, S., HUP, G., EXTERKATE, F.A. y STADHOUDERS, J. (1983). Bitter flavour in cheese. 2. Model studies on the formation and degradation of bitter peptides by proteolytic enzymes from calf rennet, starter cells and starter cell fractions. *Neth. Milk Dairy J.* 37, 169-180.
- WEBER, F. y RAMET, J.P. (1990). 2. Tecnología comparada del afinado de los diferentes tipos de queso. En "El queso". Ed. A. Eck. Editorial Omega, S.A., Barcelona.
- WESSELS, D., JOOSTE, P.J. y MOSTERT, J.F. (1988). The prevalence of *Enterococcus* species in milk and dairy products. *S.A. J. Dairy Sci.* 20, 68-72.
- WESSELS, D., JOOSTE, P.J. y MOSTERT, J.F. (1990). Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolated from milk and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 10, 349-352.
- WILLIAMS, A.M., RODRIGUES, U.M. y COLLINS, M.D. (1991). Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Res. Microbiol.* 162, 67-74.

